

Untersuchungen zum Aktivierungsverhalten des Toll-like Rezeptor 8

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Philipp Schönberg

geboren am 15.09.1987 in Cottbus

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Ralf Mrowka, Universitätsklinikum Jena**
- 2. Prof. Dr. Michael Börsch, Universitätsklinikum Jena**
- 3. Prof. Dr. Stefan Wölfl, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Das Immunsystem	3
1.2 Allgemeines zu den <i>Toll-like</i> Rezeptoren	3
1.3 Eigenschaften intrazellulärer TLRs, im Besonderen TLR8	6
1.3.1 Lokalisation und Agonisten	6
1.3.2 Intrazelluläre Lokalisierung, Aufbau und Ligandenbindung von TLR8.....	6
1.3.3 Ligandenspezifität der intrazellulären TLRs.....	8
1.4 Medikamentöse Modulation von TLRs	9
2 Zielsetzung der Arbeit	10
3 Material und Methoden	11
3.1.1 Verwendete Plasmide	11
3.1.2 Isolation von Plasmid-DNA	11
3.1.3 Strategien zur Relokalisierung des TLR8 in die äußere Zellmembran	12
3.1.4 Vorhersage der dreidimensionalen Struktur von TLR8-YFP und TLR5/8-CFP.....	17
3.1.5 Vermehrung von Plasmiden in <i>E. coli</i>	17
3.1.6 Herstellung von Kryokulturen.....	18
3.2 Zellkulturarbeiten	18
3.2.1 Verwendete Zelllinien	18
3.2.2 Kultivierung und Passage von Zellen.....	20
3.2.3 Auftauen von Zellen.....	20
3.2.4 Einfrieren von Zellen	21
3.2.5 Transiente Transfektion von Zellen mit TLR8-Konstrukten	21
3.2.6 Generierung stabiler Zelllinien.....	22
3.3 Stimulationsversuche unter Verwendung eines Luciferase-Reporter-Systems ...	24
3.3.1 Grundlagen des Luciferase-Reporter-Systems.....	24
3.3.2 Aktivierung stabiler TLR8- bzw. TLR5/8-Zelllinien mit R848.....	25
3.3.3 Messung und Auswertung der Stimulationsversuche	25
3.3.4 Statistische Auswertung	26
3.4 Optische Lokalisierung der TLR8-Konstrukte.....	26
3.5 Screening zur TLR8- bzw. TLR5/8-Aktivierung durch Wirkstoffe zugelassener Medikamente	27
3.5.1 Stimulationsversuche mit einer Medikamentenbibliothek.....	27
3.5.2 Stimulationsversuche mit ausgewählten Substanzen	28

4	Ergebnisse	29
4.1	Potentielle Lokalisierungssequenzen von TLR8.....	29
4.2	Stimulation von Luciferase-Reporterzellen mit transienter Expression von TLR8-Mutanten.....	32
4.2.1	Zeitabhängiger Aktivierungsverlauf infolge Stimulation durch R848.....	32
4.2.2	Vergleich der Aktivierungsverläufe nach Stimulation mit R848.....	38
4.3	Stimulation von Luciferase-Reporterzellen mit stabiler Expression von TLR8 bzw. TLR5/8 mit R848	39
4.4	Quantitative Bestimmung der Rezeptormenge der stabilen TLR8- und TLR8-5/8-Zelllinien mittels <i>Real-time quantitative PCR</i>	42
4.5	Vorhergesagte Tertiärstruktur von TLR8-YFP	43
4.6	Mikroskopischer Nachweis der TLR8-Konstrukte	44
4.7	Screening zur Aktivierbarkeit vom TLR8-Wildtyp und TLR5/8 durch zugelassene Medikamente.....	45
5	Diskussion	50
5.1	Vergleichende Untersuchung des Aktivierungsverhaltens TLR8-exprimierender Zellen infolge R848-Stimulation	50
5.2	Screening zur medikamentösen Aktivierbarkeit TLR8-exprimierender Zellen...	54
6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	56
7	Literaturverzeichnis.....	58
8	Anhang	63
8.1	Abbildungsverzeichnis	63
8.2	Tabellenverzeichnis.....	64
8.3	Materialien	65
8.4	Danksagung.....	73
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung	74

Abkürzungsverzeichnis

BES	N,N-Bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaar(e)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbeccos's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
ECD	Ektodomäne
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FDA	<i>U.S. food and drug administration</i> (US-Arzneimittelbehörde)
FKS	Fetales Kälberserum
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACI	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-Ethansulfonsäure
ICD	Intrazelluläre Domäne
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
LB-Agar/-Medium	Luria Bertani-Agar/Medium
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine rich repeat</i>
LRRCT	<i>Leucine rich repeat C-terminal domain</i>
LRRNT	<i>Leucine rich repeat N-terminal domain</i>
LSM	Laser Scanning-Mikroskop
LTR	<i>Long terminal repeat</i>

MCS	<i>Multiple cloning-site</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NEB	<i>New England biolabs</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
ori	<i>Origin of replication</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered serum</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PSG 4	<i>Pregnancy-specific β-1-glycoprotein 4</i>
qPCR	Quantitative PCR
R848	Resiquimod
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene-I</i>
RLR	<i>Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rt-PCR	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
ssRNA	Einzelsträngige Ribonukleinsäure
TIR	<i>Toll/interleukin 1-receptor</i>
TIRAP	<i>Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β (TRIF) - related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
UNC93B1	<i>UNC-93 homolog B1, TLR signaling regulator</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind als Teil des angeborenen Immunsystems in der Lage, für Bakterien, Viren und Pilze charakteristische Moleküle zu binden. Infolge der Bindung kommt es zu einer Aktivierung der jeweils nachgeschalteten Signalkaskade, welche in der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine mündet und so eine Immunreaktion in Gang setzt. TLR8 gehört zur Subgruppe der intrazellulären TLRs und wird hauptsächlich in endosomalen Membranen exprimiert. TLR8 bindet per Endozytose aufgenommene und prozessierte RNA-Fragmente. Diese stammen in erster Linie von Viren, jedoch in einigen Fällen auch von Bakterien wie *Helicobacter pylori* oder *Borrelia burgdorferi*. Neben diesen natürlichen Liganden existieren synthetische Liganden wie Resiquimod (R848), welche ebenfalls agonistisch am TLR8 wirken. Bei den anderen, intrazellulären TLRs (TLR3, 7 und 9) sind die für die intrazelluläre Lokalisation relevanten Aminosäuresequenzen bekannt. Gemäß unserem Kenntnisstand wurde eine entsprechende Lokalisierungssequenz beim TLR8 bisher nicht identifiziert. Es existieren jedoch Hinweise darauf, dass sich diese innerhalb der intrazellulären Domäne des TLR8 befindet.

Wir identifizierten mittels tiefgründiger Literaturrecherche bzw. bioinformatischer Analyse insgesamt fünf potentielle Lokalisierungssequenzen innerhalb der Aminosäuresequenz des TLR8 und klonierten entsprechende TLR8-Konstrukte, jeweils mit einer Mutation oder Deletion einer dieser Sequenzen. Zudem wurde ein chimäres TLR8-Konstrukt, bestehend aus der extrazellulären Domäne von TLR8 sowie der Transmembran- und intrazellulären Domäne des normalerweise zellmembranständigen TLR5 generiert. Mit diesen Konstrukten transfizierte Luciferase-Reporterzellen wurden mittels des synthetischen TLR8-Liganden R848 stimuliert. Hierbei wurde für ein Konstrukt mit der Mutation Y871A sowie für das chimäre Konstrukt eine verstärkte Aktivierung der TLR8-Signalkaskade im Vergleich zum TLR8-Wildtyp gemessen. Dies werteten wir in Übereinstimmung mit Literaturergebnissen als Hinweis dafür, dass diese Konstrukte in der äußeren Zellmembran lokalisiert sein könnten. Anschließend wurde die Expression dieser Konstrukte in der Zelle fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Hierbei zeigte sich eine Verteilung der Rezeptoren innerhalb des Zytoplasmas der Zellen. Eine genaue Zuordnung zu bestimmten Zellorganellen war nicht möglich.

Des Weiteren wurde ein Screening bezüglich der Stimulierbarkeit TLR8-transfizierter Luciferase-Reporterzellen durch einen Großteil der von der *U.S. food and drug administration* (FDA) zugelassenen Medikamente durchgeführt. Dabei stellte sich u.a. die Substanz Vorinostat als Aktivator dar. Es ist bekannt, dass dieser Histon-Deacetylase-Inhibitor eine verstärkte NF- κ B-Expression bewirken kann. Diese scheint gemäß unserer Ergebnisse TLR8-abhängig zu sein. Dieses Vorgehen bietet einen möglichen Ansatz für die Überprüfung der Wirkmechanismen immunmodulierender Medikamente.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Eine zentrale Aufgabe des körpereigenen Immunsystems ist die Erkennung und Abwehr von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Viren, Protozoen). Am Ende der Abwehrreaktion stehen die Elimination des Pathogens und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Des Weiteren werden durch das Immunsystem körpereigene, entartete Zellen erkannt und eliminiert (Murphy 2018).

Im Fall einer Infektion wird eine Immunantwort zunächst durch Zellen des angeborenen Immunsystems initiiert. Diese sind Träger sogenannter *Pattern-recognition-receptors* (PRRs). Hierzu gehören beispielsweise die in der Arbeit verwendeten TLRs. Mittels der PRRs sind die Zellen in der Lage, auf der Oberfläche der Pathogene befindliche Moleküle, sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), zu erkennen und so körperfremdes von körpereigenem Material zu unterscheiden. In der Folge kommt es zu einer Aktivierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen sowie des Komplementsystems, welche die eingedrungenen Pathogene mittels unterschiedlicher Mechanismen eliminieren können (Kaufmann 2014).

Neben den erwähnten Prozessen kommt es ebenfalls zur Aktivierung der spezifischen Immunabwehr; diese wird hervorgerufen durch von den Zellen des angeborenen Immunsystems produzierte Entzündungsmediatoren sowie über die Präsentation von Antigenen durch dendritische Zellen und Makrophagen. Die spezifische Immunabwehr umfasst eine antikörpervermittelte Immunantwort sowie die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, welche durch ein komplexes Zusammenspiel von B- und T-Lymphozyten hervorgerufen wird (Hof 2017).

1.2 Allgemeines zu den *Toll-like* Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zu den PRRs, ebenso wie die *Retinoic acid-inducible gene-I* (RIG-I)-like Rezeptoren (RLRs) sowie die *Nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren (NLRs). Alle genannten Rezeptoren sind damit Teil des angeborenen Immunsystems. Ihre Aufgabe ist es, charakteristische Bestandteile von

Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten zu erkennen und eine entsprechende Immunreaktion in Gang zu setzen (Murphy 2018).

TLRs sind Typ-I-Transmembranproteine. Sie besitzen eine Ektodomäne (ECD), in der mehrere *Leucine-rich repeats* (LRRs) enthalten sind. Diese sind für eine Ligandenbindung essentiell (Bell et al. 2003). Des Weiteren bestehen TLRs aus einer Transmembrandomäne (TMD), einem Linker und einer Toll/Interleukin 1-Rezeptor (TIR)-Domäne. Linker und TIR-Domäne bilden zusammen die intrazelluläre Domäne (ICD) eines TLRs (Akira und Takeda 2004). In Experimenten mit chimären TLRs, bestehend aus TLR9 und TLR4, zeigte sich, dass TMD und ICD für einen Erhalt der Funktionalität des Rezeptors nicht getrennt werden dürfen und stets vom selben Rezeptortyp stammen müssen (Barton et al. 2006).

Beim Menschen sind bis dato 10 verschiedene Typen von TLRs identifiziert worden. Im Gegensatz dazu sind bei Mäusen 13 Typen von TLRs bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass beim Menschen die TLR-Typen 11 bis 13 im Laufe der Evolution verloren gegangen sind (Kawai und Akira 2010).

TLRs werden entsprechend ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle in zwei Subgruppen eingeteilt: solche, die in der äußeren Zellmembran lokalisiert sind und solche, die in den Membranen intrazellulärer Vesikel wie Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen exprimiert werden. Die erste Gruppe, bestehend aus TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6, erkennt und bindet v.a. Komponenten der Zellmembran von Mikroorganismen wie Lipopolysaccharid (LPS), Lipoproteine oder Flagellin. Die zweite Gruppe, bestehend aus TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9, reagiert auf Ribonukleinsäure (RNA)- und Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bestandteile von Mikroorganismen, v.a. von Viren (Blasius und Beutler 2010, Shah et al. 2014). Erst in den letzten Jahren wurde auch eine Reaktion intrazellulärer TLRs auf bakterielle Bestandteile, beispielsweise von Gruppe B-Streptokokken, nachgewiesen (Mancuso et al. 2009). TLR10 wird ebenfalls in der äußeren Zellmembran exprimiert (Hess et al. 2017), ein Ligand konnte gemäß unserem Kenntnisstand bisher jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden (Oosting et al. 2014).

Nach Aktivierung eines TLRs durch seinen spezifischen Liganden kommt es je nach TLR-Subtyp zur Aktivierung der *Myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88)-abhängigen Signalkaskade (TLR1, TLR2, TLR5 – 9) oder der *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF)-abhängigen Signalkaskade (TLR3). TLR4 ist in der Lage, beide Signalwege zu aktivieren (Kawai und Akira 2006, Kawasaki und Kawai

2014). Diese Signalwege münden in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) oder *Interferon regulatory factor* (IRF) 3 bzw. 7. Konsekutiv kommt es zur vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine und von Typ I-Interferonen. Diese bewirken die Initialisierung einer Entzündungsreaktion zur Abwehr des eingedrungenen Mikroorganismus (Kawai und Akira 2010). TLR10 scheint in diesem Zusammenhang eine Sonderrolle einzunehmen: Er interagiert zwar mit dem Adapterprotein MyD88, führt jedoch über einen noch nicht eindeutig identifizierten Weg zu antiinflammatorischen Effekten (Oosting et al. 2014). Abb. 1.1 zeigt eine Übersicht über die TLRs 1 – 9, ihre jeweiligen Liganden und die nachgeschaltete Signalkaskade.

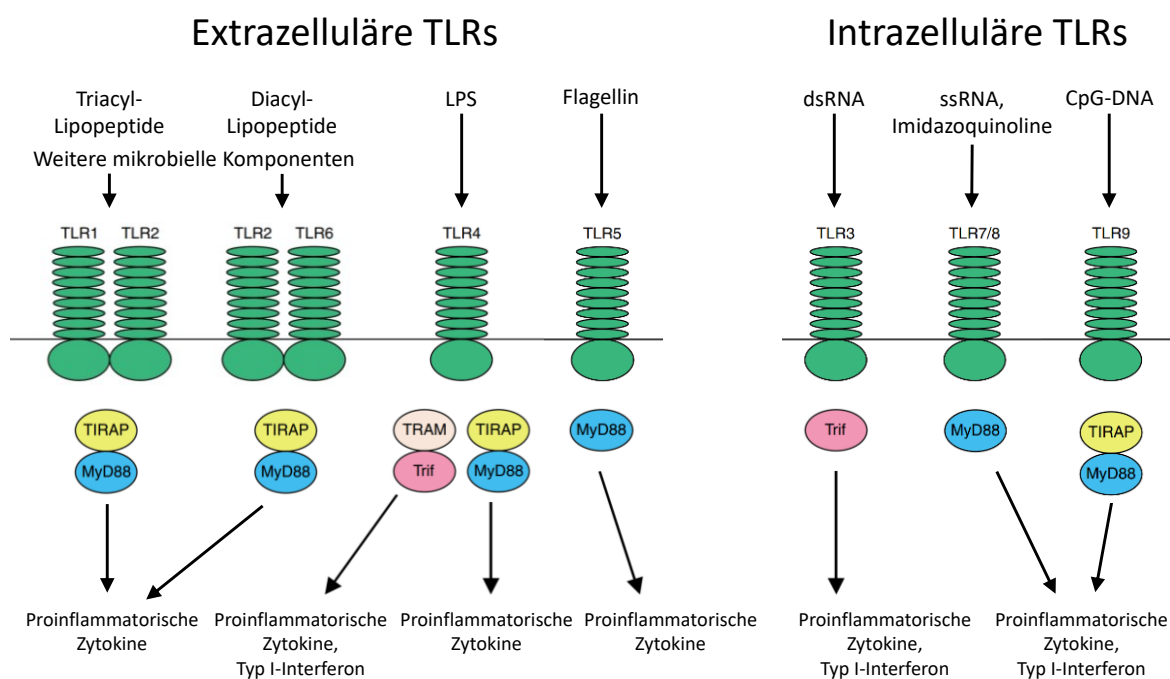


Abb. 1.1 Übersicht über Lokalisation, Liganden und Signalwege humaner TLRs

Dargestellt sind alle beim Menschen bekannten TLRs, gruppiert hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation. Jeweils mit aufgeführt sind die zugehörigen Liganden, nachgeschalteten Signalwege sowie die durch Aktivierung des TLRs ausgelöste Reaktion. LPS: Lipopolysaccharid, dsRNA: doppelsträngige RNA, ssRNA: einzelsträngige RNA. TIRAP, MyD88, TRAM und Trif sind Adaptermoleküle, welche vom TLR nach Aktivierung rekrutiert werden und die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade vermitteln können. (Modifiziert nach Kawai und Akira 2006 sowie Kawasaki und Kawai 2014).

1.3 Eigenschaften intrazellulärer TLRs, im Besonderen TLR8

1.3.1 Lokalisation und Agonisten

TLR8 gehört neben TLR3, 7 und 9 zur Subgruppe der intrazellulären TLRs. Er kann in endosomalen Membranen, jedoch im Gegensatz zu den anderen, intrazellulären TLRs zu einem geringen Anteil auch in der äußeren Zellmembran nachgewiesen werden (Miggin und O'Neill 2006, Tanji et al. 2016).

TLR8 wird zum einen in myeloiden Zellen wie Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen sowie myeloiden dendritischen Zellen, zum anderen in regulatorischen T-Zellen exprimiert (Ishii et al. 2014). Er ist in der Lage, virale, Guanin- und Uracil-reiche, einzelsträngige RNA (ssRNA), synthetische Einzelstrang-Oligoribonukleotide, kurze, doppelsträngige RNA (dsRNA)-Stücke sowie synthetische Imidazoquinolinderivate wie R848 oder CL097 zu binden. Zudem werden auch bakterielle RNA-Fragmente, beispielsweise von *Escherichia coli* (*E. coli*) oder *Borrelia burgdorferi*, erkannt (Forsbach et al. 2008, Ohto et al. 2014, Cervantes et al. 2012).

1.3.2 Intrazelluläre Lokalisierung, Aufbau und Ligandenbindung von TLR8

TLR8 wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet und über mehrere Zwischenstationen schließlich zum Bestimmungsort in den endosomalen Membranen transportiert. Für den Exit aus dem ER sowie den Transport zum Golgi-Apparat zeigt sich das Transportprotein *UNC-93 homolog B1*, *TLR signaling regulator* (UNC93B1) essentiell, welches mit der TMD von TLR8 interagiert (Ishii et al. 2014, Itoh et al. 2011). Für den Transport zum eigentlichen Zielort scheint gemäß früherer Studien eine bis dato unbekannte Lokalisierungssequenz innerhalb der TIR-Domäne von TLR8 essentiell zu sein: Diese Hypothese wird dahingehend gestützt, dass ein TLR8-Konstrukt mit deletierter TIR-Domäne in der äußeren Zellmembran nachgewiesen werden kann (Itoh et al. 2011). Die ECD hingegen scheint keinen Einfluss auf die Lokalisation eines TLRs zu haben (Nishiya und DeFranco 2004). Abb. 1.2 zeigt den schematischen Aufbau des Rezeptors.

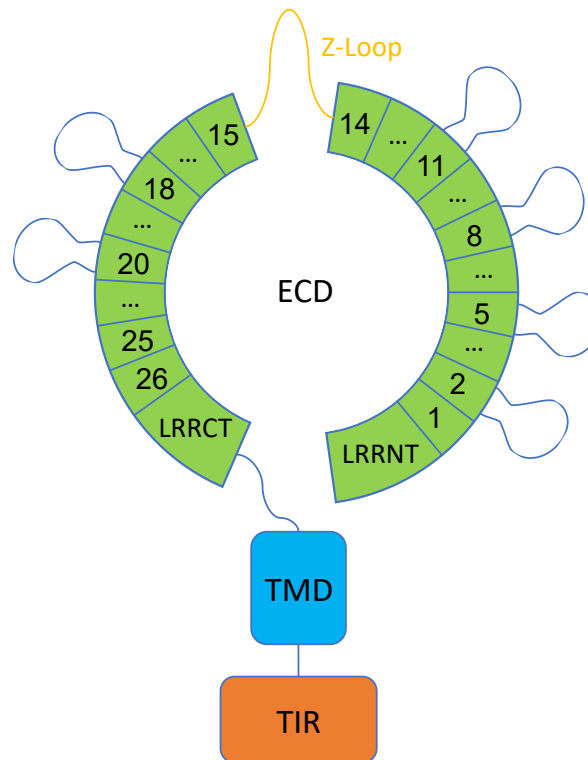


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von TLR8

Der grüne Abschnitt repräsentiert die ECD mit insgesamt 26 LRRs. Der Z-Loop, an welchem die Prozessierung erfolgt, ist gelb dargestellt. Des Weiteren folgen die TMD (blau) und TIR-Domäne (orange), über welche eine Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade initiiert wird. Nicht explizit dargestellt wurde ein kurzer Linker zwischen TMD und TIR-Domäne. ECD: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, TIR: *Toll/Interleukin 1-receptor*, LRR: *Leucine-rich repeat*, (modifiziert nach Tanji et al. 2016).

Die Strukturen der intrazellulären TLRs sind eng miteinander verwandt. Die ECDs enthalten jeweils 26 LRRs, sodass die ECD auch als LRR-Domäne bezeichnet werden kann. Die LRRs sind für eine funktionierende Ligandenbindung unerlässlich (Bell et al. 2003).

Zwischen LRR14 und LRR15 von TLR8 befindet sich ein *Z-Loop*. Hierbei handelt es sich um eine *Loop*-Region des Proteins, bestehend aus ca. 30 Aminosäuren. In diesem Bereich kommt es im Rahmen der Prozessierung des TLR8, welche im Endosom stattfindet, zur Spaltung der Aminosäurekette. Die so erhaltenen Bruchstücke bleiben über verschiedene Mechanismen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen weiterhin in Kontakt und sind beide an der Ligandenbindung beteiligt (Ohto et al. 2014).

Der prozessierte TLR8 liegt bereits in ligandenungebundener Form als Homodimer vor. Nach Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Dimers, was für eine Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade essentiell ist (Tanji et al. 2013).

Die Bindung kleiner Moleküle wie chemischer Liganden (z.B. R848) oder von Uridin-Mononukleosiden kann so durch Interaktion der einander zugewandten LRR11 – 14 des einen Protomers mit den LRR16 – 18 des anderen Protomers und umgekehrt erfolgen (Tanji et al. 2015).

Eine zweite Bindungsstelle für größere Moleküle wie ssRNA befindet sich im Bereich der LRR10 – 13 auf der konkaven Außenseite der TLR8-Protomere. Diese liegen außerhalb des Interaktionsbereichs der beiden Protomere, sodass theoretisch für eine Ligandenbindung in diesem Bereich keine Dimerisierung erforderlich ist (Tanji et al. 2015).

Durch Ligandenbindung an der ECD und der folgenden Konformationsänderung der TLR8-Protomere kommt es zur Rekrutierung des Adapterproteins MyD88 an die TIR-Domäne. Dies vermittelt die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade, welche zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt und schließlich in der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 und Typ-I-Interferonen mündet. (Tanji et al. 2016, Ohto et al. 2014)

1.3.3 Ligandenspezifität der intrazellulären TLRs

Die intrazellulären TLRs sind verantwortlich für die Erkennung von Nukleinsäuren und die Einleitung einer entsprechenden Immunreaktion. Wichtig hierbei ist die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Nukleinsäuren (Murphy 2018).

Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist der Aufbau der Nukleinsäuren: Viren können RNA oder DNA, jeweils in einzel- oder doppelsträngiger Form enthalten (Dörries 2017). DNA enthält hierbei häufig nicht-methylierte CpG-Motive, was sie von der doppelsträngigen DNA von Säugern unterscheidet (Murphy 2018). Unterschiede dieser Art werden ausgenutzt, indem beispielsweise TLR9 spezifisch nicht-methylierte CpG-Motive in Nukleinsäuren binden und eine Abwehrreaktion auslösen kann (Barton 2007).

Einen weiteren Aspekt zur Unterscheidung körpereigener von körperfremder DNA stellt die räumliche Trennung der Nukleinsäuren dar. Viren und einige Bakterien werden mittels verschiedener Mechanismen in die Zellen aufgenommen und dort prozessiert. In diesem Rahmen wird die enthaltene, mikrobielle Nukleinsäure den intrazellulären TLRs in den endosomalen Kompartimenten verfügbar gemacht. Körpereigene DNA erhält zu diesem Bereich normalerweise keinen Zugang und kann somit auch nicht von den intrazellulären TLRs gebunden werden (Blasius und Beutler 2010).

In früheren Experimenten konnte die Bedeutung der Lokalisation der TLRs gezeigt werden: Die ECD des eigentlich intrazellulär lokalisierten TLR9 wurden mit Teilen von TLR4 kombiniert. Der entstandene, chimäre TLR9/4 wurde in der äußeren Zellmembran nachgewiesen. Dieser Rezeptor war im Gegensatz zum TLR9-Wildtyp in der Lage, körpereigene DNA zu erkennen und die nachgeschaltete Signalkaskade zu aktivieren. Die Antwort auf virale Nukleinsäuren war jedoch vermindert. Synthetische Liganden wurden von beiden Rezeptortypen erkannt (Barton et al. 2006).

1.4 Medikamentöse Modulation von TLRs

TLRs können neben ihren natürlichen Liganden auch synthetische Liganden, Medikamente oder natürliche Wirkstoffe binden. Diese können agonistisch oder antagonistisch wirken. Hierdurch wird eine gezielte Modulation des Immunsystems möglich (Mifsud et al. 2014). Beispielsweise sind für TLR4 neben natürlichen Liganden wie Flagellin und Curcumin auch medikamentöse Modulatoren wie Eritoran bekannt (Akira und Takeda 2004, Kim et al. 2007, Opal et al. 2013, Zhang und Zeng 2019). Hingegen sind für TLR8 gemäß unserem Kenntnisstand bis dato einzig natürliche Liganden wie einzelsträngige RNA sowie eine Reihe synthetischer Liganden, v.a. Imidazoquinolinderivate, identifiziert (Cervantes et al. 2016). Während synthetische TLR-Liganden bezüglich einer immunmodulatorischen Behandlung von beispielsweise infektiösen Krankheiten wie Hepatitis B oder Neoplasien wie dem Basalzellkarzinom erforscht werden (Kanzler et al. 2007), ist unklar, inwiefern bekannte Medikamente das TLR8-Signaling beeinflussen. Diesbezüglich führten wir ein Screening durch mit dem Ziel, TLR8-modulierende Medikamente zu identifizieren.

2 Zielsetzung der Arbeit

TLR8 ist ein Rezeptor des angeborenen Immunsystems (Shah et al. 2014), welcher neben ssRNA, seinem natürlichen Liganden, auch synthetische Liganden wie R848 binden kann (Jurk et al. 2002, Cervantes et al. 2012). Infolge Ligandenbindung kommt es zur Aktivierung der MyD88-abhängigen Signalkaskade, welche zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (Kawai und Akira 2006). TLR8 ist hauptsächlich in endosomalen Membranen lokalisiert (Miggin und O'Neill 2006). Gemäß unserem Kenntnisstand ist der verantwortliche Abschnitt innerhalb der Aminosäuresequenz des TLR8, der für dessen intrazelluläre Lage verantwortlich ist, bis dato unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation einer entsprechenden Lokalisierungssequenz, um die Lokalisation des TLR8 beeinflussen und sein Aktivierungsverhalten abhängig von der zellulären Lokalisation untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurden rechnergestützt und mittels tiefgründiger Literaturrecherche potentielle Lokalisierungssequenzen identifiziert und entsprechende TLR8-Konstrukte mit Mutationen bzw. Deletionen dieser potentiellen Lokalisierungssequenzen hergestellt. Des Weiteren wurde ein chimärer TLR, bestehend aus der ECD von TLR8 sowie der TMD und ICD von TLR5, generiert. Die anschließende Überprüfung der zellulären Lokalisation dieser TLR8-Mutanten erfolgte zum einen funktionell mittels eines im Labor bereits etablierten Reporterassays. Gemäß unserer Hypothese dürfte ein in die Plasmamembran relokalisierter TLR8 eine verstärkte Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade auslösen. Zum anderen wurde die Expression der verschiedenen TLR8-Mutanten epifluoreszenzmikroskopisch überprüft.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Medikamente in der Lage sind, eine TLR8-Aktivierung hervorzurufen. Zu diesem Zweck wurde in einem Reporterassay die Wirkung der meisten der durch die *Food and drug administration* (FDA) zugelassenen Medikamente auf TLR8 untersucht.

3 Material und Methoden

3.1.1 Verwendete Plasmide

Die Plasmide *Addgene Plasmid #13019: pcDNA3-TLR5-CFP* sowie *Plasmid #13024: pcDNA3-TLR8-YFP* wurden durch das Labor von Doug Golenbock via *Addgene* zur Verfügung gestellt. Den genauen Aufbau der Plasmide zeigt Abb. 3.1. In unserem Labor wurden sie in Form von Kryokulturen, bestehend zu 3/5 aus dem *E. coli*-Stamm *DH5a* sowie zu 2/5 aus 50 %iger Glycerinlösung, bei -80 °C gelagert.

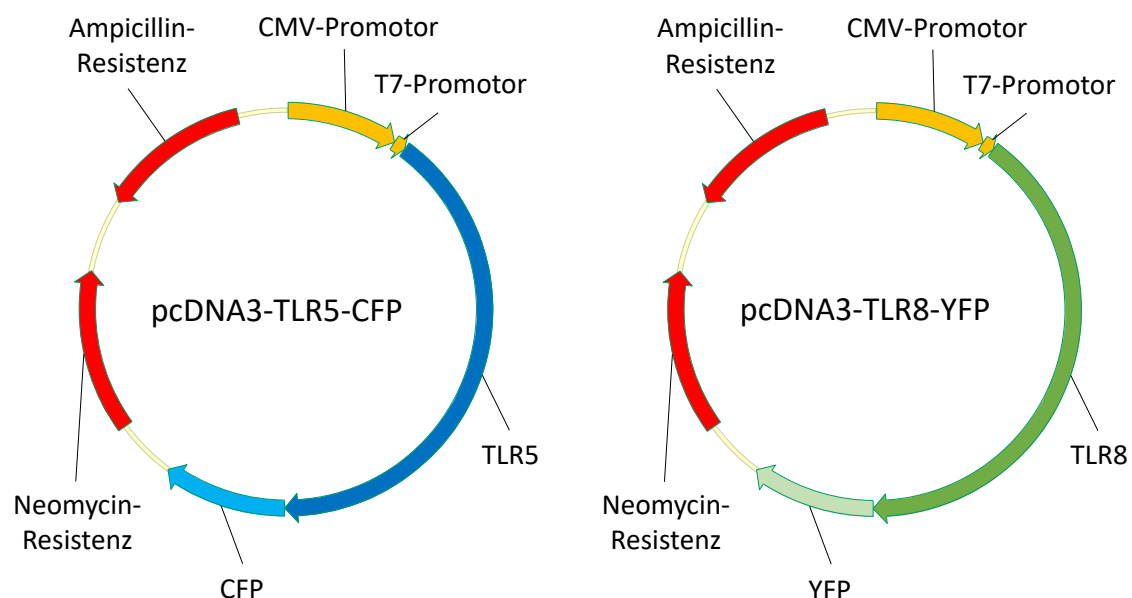


Abb. 3.1: Aufbau der *Addgene*-Plasmide: *pcDNA3-TLR5-CFP* und *pcDNA3-TLR8-YFP*

Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide. Rot markiert sind Resistenzen gegen Selektionsmedien. Die Promotoren (orange) regulieren die Expression der Zielgene (blau bzw. grün). Jeweils heller (hellblau bzw. hellgrün) dargestellt sind die an die TLRs gekoppelten Fluoreszenzproteine: CFP: *Cyan fluorescent protein* bzw. YFP: *Yellow fluorescent protein*. CMV: *Zytomegalievirus*.

3.1.2 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden entsprechende *Top 10-E. coli*-Bakterien in flüssigem Luria Bertani (LB)-Medium für 12-18 h im Schüttelinkubator bei 37 °C und Raumluft bebrütet. Anschließend erfolgte die Isolation der enthaltenen Plasmide unter Verwendung des *QIAprep Spin Miniprep Kits* der Firma QIAGEN entsprechend des durch

den Hersteller bereitgestellten Protokolls (QIAGEN 2015). Abschließend wurde die Plasmidintegrität per Restriktionsverdau überprüft und bei Bedarf eine Sequenzierung durch die Firmen *mwg Eurofins Genomics* oder *SeqLab* veranlasst.

3.1.3 Strategien zur Relokalisierung des TLR8 in die äußere Zellmembran

3.1.3.1 Identifikation möglicher Lokalisierungssequenzen anhand in der Literatur beschriebener Grundsequenzen

Über Lokalisierungssequenzen können einerseits die Internalisierung zellmembranständiger Proteine und ihr Targeting in Endo- oder Lysosomen veranlasst werden (Bonifacino und Traub 2003). Andererseits sind sie für den Transport von Proteinen vom Bildungsort im ER zum gewünschten, zellulären Kompartiment unabdingbar. Häufig bilden sie dabei Bindungsstellen für die entsprechenden Transportproteine (Trowbridge et al. 1993). Es wird zwischen tyrosinbasierenden und dileucinbasierenden Sequenzen unterschieden, wobei das Tyrosin bei den tyrosinbasierenden Sequenzen essentiell für deren Funktion ist (Bonifacino und Traub 2003). Für TLR8 scheint die ICD für die intrazelluläre Lokalisation unverzichtbar zu sein (Itoh et al. 2011). Wir verglichen die von Bonifacino und Traub beschriebenen Grund-Lokalisierungssequenzen mit der ICD von TLR8 und identifizierten so potentielle Kandidaten für eine Lokalisierungssequenz, die für den Transport des TLR8 zum Endosom verantwortlich sein könnten.

3.1.3.2 Identifikation möglicher Lokalisierungssequenzen mittels Vergleichs der Proteinsequenzen aller endosomalen Proteine

Bei Proteinen, die in endosomalen Membranen exprimiert werden, muss es einen verantwortlichen Mechanismus geben, der für den Transport der Proteine vom ER an ebendiese Lokalisation verantwortlich ist. Wir gingen davon aus, dass dieser Mechanismus zumindest bei einem Teil der endosomalen Proteine einer Lokalisierungssequenz entspricht. Es ist anzunehmen, dass sich diese Sequenzen ähneln und in Teilen identisch sind.

Wir nutzten die Funktion „BioMart“ von der Internetplattform „Ensembl“, um die Aminosäuresequenzen aller humanen Proteine, die in endosomalen Membranen lokalisiert

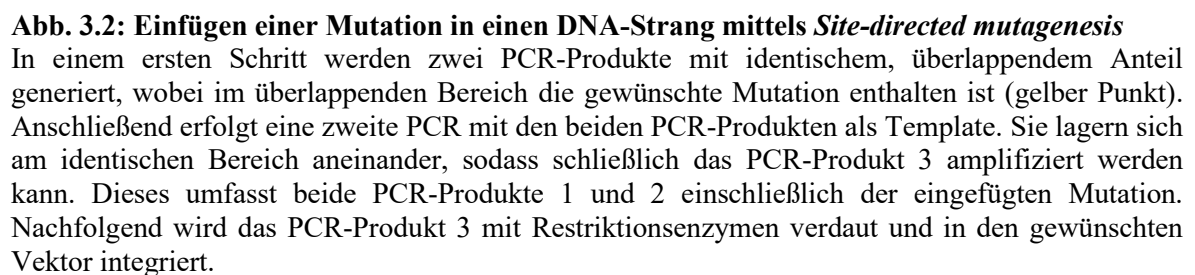
sind, herunterzuladen (Zerbino et al. 2018). Anschließend wurden diese Sequenzen unter Verwendung des Programms „R“ in kurze Sequenzen von vier Aminosäuren geteilt (R-Core-Team 2017). Jedes dieser Bruchstücke war dabei in Bezug auf das vorhergehende Bruchstück um eine Aminosäure nach hinten verschoben, sodass sich diese beiden Bruchstücke um drei Aminosäuren überlappten. Bei einer Aminosäuresequenz „ABCDEFGH“ würden so die Bruchstücke „ABCD“, „BCDE“, „CDEF“ und „DEFG“ entstehen. Identische Bruchstücke wurden schließlich zusammengefasst und gezählt (Daten nicht dargestellt).

3.1.3.3 Generierung von TLR8-Konstrukten mit Mutationen/Deletionen potentieller Lokalisierungssequenzen

Im Folgenden wurde für jede potentielle Lokalisierungssequenz ein TLR8-Konstrukt kloniert, in dem diese Sequenz, bestehend aus 4 – 7 Aminosäuren bzw. 12 – 21 Basenpaaren (bp), deletiert wurde. Für zwei besonders nahe an der TMD gelegene, potentielle Lokalisierungssequenzen wurde zudem nur das für die Funktion der tyrosinbasierten Lokalisierungssequenz essentielle Tyrosin (Y) durch Alanin (A) ersetzt. Alle Mutationen wurden mittels *Side-directed mutagenesis* durchgeführt. Diese Technik beschreibt eine PCR, bei der in einem der beiden Primer die gewünschte Mutation bereits enthalten ist. Bei entsprechend niedrig gewählter Annealing-Temperatur lagert sich dieser trotz nicht 100%iger Übereinstimmung an die Template-DNA an. Das PCR-Produkt wird dann die entsprechende Mutation enthalten.

In unserem Fall wurde die Technik aufgrund der Größe der einzufügenden Mutationen leicht abgewandelt (dargestellt in Abb. 3.2): Zunächst wurden im PCR-Schritt 1 die PCR-Produkte 1.1 und 1.2 generiert, von denen eines 5'- und eines 3'-wärts der Mutation lag. Beide PCR-Produkte überlappten in einem Bereich von 10 – 20 bp und enthielten in diesem Bereich bereits die gewünschte Mutation. Dies wurde durch die Verwendung entsprechender Primer gewährleistet. Beim Design der die Mutation enthaltenden Primer wurde darauf geachtet, dass die *Annealing*-Temperatur der einander überlappenden PCR-Produktanteile annähernd mit der in PCR-Schritt 1 notwendigen *Annealing*-Temperatur übereinstimmt.

Unter Nutzung der beiden PCR-Produkte 1.1 und 1.2 als Template sowie des Senseprimers von PCR-Produkt 1.1 und des Antisenseprimers von PCR-Produkt 1.2 wurde anschließend eine Overlap extension PCR durchgeführt. Dabei lagerten sich die PCR-Produkte 1.1 und



Mittels zweier Restriktionsendonukleasen wurden dann das entstandene PCR-Produkt 3 sowie das TLR8-Plasmid getrennt über 1 – 2 h verdaut und das PCR-Produkt mittels T4 DNA-Ligase entsprechend des Herstellerprotokolls in die entstandene Lücke im TLR8-Plasmid ligiert. Dadurch wurde die ursprüngliche Sequenz des TLR8 durch eine mutierte Sequenz ersetzt. Die anschließende Transformation des Konstrukts in *Top10-E. coli*-Bakterien wird unter Absatz 3.1.5 beschrieben. Die Plasmidintegrität wurde per Testverdau überprüft. Die Korrektheit der Sequenz wurde im letzten Schritt mittels Sequenzierung durch die Firmen *mwg Eurofins Genomics* oder *SeqLab* überprüft.

Eine Auflistung der so generierten TLR8-Konstrukte mit Mutationen bzw. Deletionen der verschiedenen, potentiellen Lokalisierungssequenzen zeigt Tab. 3.1.

Tab. 3.1: Übersicht über generierte TLR8-Konstrukte

Für die Beschreibung der einzelnen Aminosäuren bzw. Basen wurde der IUPAC-Code verwendet.

Konstruktname	Mutierte/deletierte Sequenz	Beschreibung
TLR8-mutY871A	2611T>G; 2612A>C	Ersatz des Y durch A (Y871A)
TLR8-mutY888A	2662T>G; 2663A>C	Ersatz des Y durch A (Y888A)
TLR8-Δ871-874	2611_2622del	Deletion der Aminosäuren YWDV (Y871_V874del)
TLR8-Δ928-933	2782_2799del	Deletion der Aminosäuren DKNVLL (D928_L933del)
TLR8-Δ979-982	2935_2946del	Deletion der Aminosäuren YLAL (Y979_L982del)
TLR8-Δ1007-1010	3019_3030del	Deletion der Aminosäuren YLRL (Y1007_L1010del)
TLR8-ΔTIR	TIR-Domäne: 2692_3177del	Deletion der TIR-Domäne (Y898_Y1059del)

3.1.3.4 Generierung eines chimären Rezeptors: TLR5/8

Wir generierten einen chimären Rezeptor, bestehend aus der ECD von TLR8 sowie der TMD und ICD von TLR5. Letzterer wird in der äußeren Zellmembran exprimiert (Shah et al. 2014). Somit besteht die Möglichkeit, dass auch unser entstandenes, chimäres Konstrukt in der äußeren Zellmembran lokalisiert sein wird (Nishiya und DeFranco 2004). Die TLR8-ECD enthält insgesamt 25 LRRs. Diese stellen die Grundlage für die Funktion der ECD dar (Bell et al. 2003). Die LRRCT-Domäne befindet sich laut Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) im Bereich der Aminosäuren Asparagin (790) – Leucin (835). Mit dem Ziel, alle LRRs sowie die LRRCT intakt zu lassen, wurde die Restriktionsstelle zur Isolation der ECD zwischen den Aminosäuren Serin (842) und Asparaginsäure (843) gewählt. Gemäß *Uniprot.org*-Datenbank beginnt die TMD von TLR5 an der Stelle Phenylalanin (640) (UniProt-Consortium 2017). Hier wurde die Restriktionsstelle drei Aminosäuren strangaufwärts gesetzt, also zwischen Lysin (636) und Serin (637). Dadurch bleiben die TMD und ICD von TLR5 ebenfalls intakt.

Die Herstellung des chimären TLR5/8-Konstrukts wird im Folgenden erklärt: In einem ersten Schritt wurde das TLR8-Plasmid *pcDNA3-TLR8-YFP* mit den Restriktionsendonukleasen BsmBI und ApaI geschnitten. Das kleinere der entstandenen, zwei Fragmente enthielt die TMD und ICD des TLR8 und wurde verworfen. Das größere Fragment mit den verbleibenden Anteilen von TLR8 (v.a. ECD) sowie dem sonstigen Plasmid wurde für die weitere Verwendung isoliert. Anschließend wurde das TLR5-Plasmid *pcDNA3-TLR5-CFP* mit den Restriktionsendonukleasen ApaI und EarI geschnitten. Von den sieben, entstandenen Fragmenten wurde jenes 1425 bp lange Fragment, welches die TMD und ICD von TLR5 enthielt, isoliert. In einem dritten Schritt erfolgte mittels PCR die Herstellung eines Adapters, der die noch im Vektor enthaltene TLR8-ECD (Schritt 1) mit der in Schritt 2 isolierten TLR5-TMD und -ICD verbinden sollte. Dazu wurde unter Verwendung der Primer LI_A_FW sowie T8-Chimer-rev das TLR8-Plasmid als Template genutzt. Die Menge des erhaltenen PCR-Produkts wurde anschließend unter Verwendung des *TOPO® TA-Cloning Kits* der Firma *Invitrogen* und kompetenter *Top10-E. coli*-Bakterien erhöht. Das erhaltene Plasmid wurde schließlich mit den Restriktionsendonukleasen BsmBI und SapI geschnitten. Das erhaltene Fragment mit einer Länge von 446 bp entsprach dem gewünschten Adapter.

Letztlich lagen nun drei verschiedene DNA-Fragmente vor: Der Vektor des TLR8-Plasmids einschließlich TLR8-ECD, jedoch ohne TMD und ICD, ein Adapter zwischen

TLR8-ECD und TLR5-TMD sowie ein Teilstück mit TLR5-TMD und -ICD. Diese wurden unter Verwendung von T4 DNA-Ligase entsprechend des Herstellerprotokolls ligiert. Nach erfolgreicher Ligation wurde das erhaltene Plasmid in kompetente *Top10-E. coli*-Bakterien transformiert und für die weitere Verwendung aufbereitet wie unter Abschnitt 3.1.5 beschrieben.

3.1.4 Vorhersage der dreidimensionalen Struktur von TLR8-YFP und TLR5/8-CFP

Wir verwendeten für unsere Experimente ein TLR8-YFP-Fusionsprotein. Die meisten Konstrukte stellten Abkömmlinge dieses Proteins dar; der chimäre TLR5/8 war hingegen mit CFP fusioniert. Es war nicht auszuschließen, dass die Fluoreszenzproteine einen Einfluss auf die Faltung des jeweiligen TLR-Anteils haben. Daher wurden unter Verwendung der Software *Phyre2* Vorhersagen der dreidimensionalen Struktur von TLR8-YFP und TLR5/8-CFP erstellt (Kelley et al. 2015). Diese wurde anschließend mittels des Programms *PyMOL* dargestellt (DeLano 2002).

3.1.5 Vermehrung von Plasmiden in *E. coli*

In einem ersten Schritt wurden die gewünschten Plasmide entsprechend eines durch die Firma *New England Biolabs GmbH* (NEB) bereitgestellten 5-Minuten Protokolls in chemisch kompetente *Top10-E. coli*-Bakterien transformiert. Die Bakterienlösung wurde anschließend gleichmäßig auf LB-Agarplatten mit einem Ampicillingehalt von 100 µg/ml verteilt. Zu diesem Zweck wurden sterile Glaskugeln ($d = 2 \text{ mm}$) verwendet. Abschließend wurden die Platten für 12 – 16 h im Inkubatorschrank bei 37 °C und Raumluft inkubiert. Eine erfolgreiche Transformation zeigte sich durch das Wachstum von Bakterienkolonien auf der Agarplatte.

Im Anschluss wurden Bakterien von je 1 Kolonie in Reaktionsgefäße mit 5 ml flüssigem LB-Medium mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml gegeben. Diese wurden unter Gewährleistung einer Luftzufuhr verschlossen und für 12 – 18 h im Schüttelinkubator bei 37 °C und Raumluft gelagert. Schließlich erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben, bei Bedarf mit anschließender Sequenzierung durch die Firmen *MWG Eurofins Genomics* oder *Seqlab*.

3.1.6 Herstellung von Kryokulturen

Das gewünschte Plasmid wurde wie unter Punkt 3.1.5. beschrieben, in *Top 10-E. coli*-Bakterien transformiert und diese auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) überbracht. Anschließend wurde von einer der Kolonien eine Flüssigkultur (5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) angelegt. Diese wurde für max. 12 h im Schüttelinkubator bei 37 °C und Raumluft inkubiert. Danach wurden 600 µl der Bakterienlösung und 400 µl von 50 %iger Glycerinlösung in einem speziellen 2 ml Kryoeinfrier Röhrchen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2 Zellkulturarbeiten

3.2.1 Verwendete Zelllinien

3.2.1.1 HEK293-Zelllinie

Für die meisten Experimente in dieser Arbeit (transiente Transfektionen, Mikroskopieexperimente) wurden Zellen der *Human embryonic kidney 293 (HEK293)*-Zelllinie genutzt. Hierbei handelt es sich um Abkömmlinge humaner Nierenzellen, welche ursprünglich durch Transformation mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 generiert worden waren (Graham et al. 1977). Aufgrund leichter Kultivierbarkeit, schnellen Wachstums, leichter Transfizierbarkeit und effizienter Proteinexpression wird diese Zelllinie weit verbreitet eingesetzt (Thomas und Smart 2005).

3.2.1.2 HEK293T-Zelllinie

Hierbei handelt es sich um Abkömmlinge der ursprünglichen *HEK293*-Zelllinie. Die Zellen produzieren eine mutierte Version des *SV40 large T*-Antigens, eines Proteins des Polyomavirus SV40 (Butel und Jarvis 1986, DuBridge et al. 1987). Dieses bindet an und inhibiert das Tumorsuppressorprotein p53 (Liljestrom et al. 2006). Aufgrund der Produktion dieses Antigens können *HEK293T*-Zellen Plasmide mit einem *SV40-origin of replication (ori)* in hohem Maß replizieren und exprimieren (Lin et al. 2014). Daher eignen sich diese Zellen hervorragend für die Virusreplikation beim Prozess zur Herstellung stabiler Zelllinien.

3.2.1.3 Luciferase-Reporterzellen

Hierbei handelt es sich um Abkömmlinge von *HEK293*-Zellen. Sie produzieren ein Luciferase-Reporterkonstrukt, welches mittels Flip/In-System stabil ins Genom der Zellen integriert wurde. Dieses besteht aus einem NF- κ B-sensitiven Promotor und einem NF- κ B *response element* mit TATA-like Promoter, welche das Gen für eine *Firefly*-Luciferase kontrollieren. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit für NF- κ B sind insgesamt drei verschiedene NF- κ B-Bindungsmotive jeweils sieben Mal im Promotor enthalten. Den genauen Aufbau des Luciferase-Reporterkonstrukts zeigen Abb. 3.3 und Abb. 3.4. Die Zellen waren in der Arbeitsgruppe bereits zuvor etabliert.

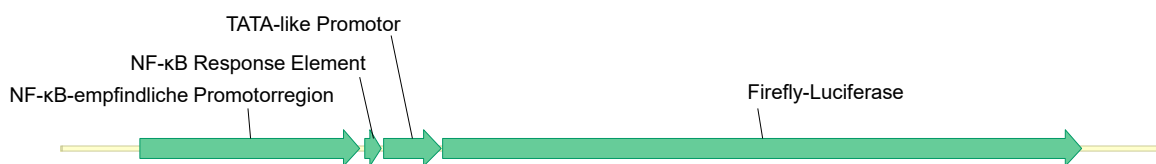


Abb. 3.3: Aufbau des Luciferase-Reporterkonstrukts

Die Abb. zeigt schematisch den Aufbau des Luciferase-Reporterkonstrukts. Die Transkription des Gens für die *Firefly*-Luciferase wird durch eine davor liegende, NF- κ B-sensitive Promotorregion in Verbindung mit dem dazugehörigen *Response element* sowie dem TATA-like Promotor kontrolliert.

1	CAGAGGATAT	ACGCGTATCG	ATCGTGATAG	ACCAGAAGGC	TCACTTGCAG	AGGGACAGGA	TTACAGGGTG	CAGGCTGCAG	
	GTCTCCTATA	TGGCATAGC	TAGCACTATC	TGGTCTTCCG	AGTGAACGTC	TCCCTGTCCT	AATGTCACAC	GTCCGACGTC	
81	GGAAGTACCG	GATAGAGGCG	TACCTGGTCG	TTAGGAGGGG	ACTTTCGGGT	CTAGGGGATT	CCCGATTCTA	TCGAGTAGGG	
	CCTTCATGGC	CTATCTCCGC	ATGGACCAGC	AATCCTCCCC	TGAAAGGCCA	GATCCCCCTAA	GGGCTAAGAT	AGTCATCCC	
161	GATTTCCTGC	AGGGGACTTT	CCGGGTGCGA	GTTCCTGGGG	ATTCCCGATA	GGGGACTTTC	CGGATCGTTA	CTGAATTATA	
	CTAAAGGACG	TCCCTGAAA	GGCCACGCT	CAAGAACCCC	TAAGGCTAT	CCCCTGAAAG	GCCTAGCAAT	GACTTAATAT	
241	GGGGATTCCC	GATCAGGGGA	TTTCCGGATA	GCTGCAGTCA	ATGTCGTAG	ATGTAGGGGA	CTTTCGGTAG	GGGATTCCCG	
	CCCCTAAGGG	CTAGTCCCT	AAAGGCCTAT	CGACGTCAGT	TACAGACATC	TACATCCCT	GAAAGGCATC	CCCTAAGGGC	
321	ATCCAGCGTG	ACCTGTAAGG	GATTTCCTGA	GCGAGGGGAC	TTTCCGGTAA	CGTGTTAGCA	TAGGGGATTCC	CCGGTAGGGG	
	TAGGTCGCAC	TGGACATCCC	CTAAAGGCAT	CGCTCCCTG	AAAGGCCATT	GCACAATCGT	ATCCCTAAG	GGCCATCCCC	
401	ATTTCCTGGAT	GGAGCATAAC	TGATAGGGGA	CTTTCGGATA	AGGGGATTCC	CGGAACITGC	AACTGCCTAT	AGGGGATTTC	
	TAAAGGCCTA	CCTCGTATTG	ACTATCCCT	GAAAGGCTAT	TCCCTAAGG	GCCTTGAACG	TTGACGGATA	TCCCTAAAG	
481	CGGATTAGGG	GACTTTCGC	TATCCGACGT	TACAGTAGGG	GATTCCCTAC	AGGGGATTTC	CGAGCCTGAC	CCCGCCCCAG	
	GCCTAATCCC	CTGAAAGGCG	ATAGGCTGCA	ATGTCATCCC	CTAAGGGATG	TCCCTAAGG	GCTCGGACTG	GGCGGGGGTC	
561	AGAGCT								
	TCTCGA								

Abb. 3.4: Basensequenz der NF- κ B-empfindlichen Promotorregion

Die verschiedenen Untereinheiten von NF- κ B binden an verschiedene DNA-Konsensussequenzen: Konsensussequenz für p50-Untereinheit: blau, Konsensussequenz für p65-Untereinheit: rot, Konsensussequenz für p105-Untereinheit: gelb (Kunsch und Rosen 1993, Kunsch et al. 1992).

3.2.2 Kultivierung und Passage von Zellen

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in T75-Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂. Als Kulturmedium wurde ein Gemisch aus 89 % *Dulbeccos's modified eagle's medium* (DMEM), 10 % fetalem Kälberserum (FKS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)-Lösung verwendet. Im Falle stabiler Zelllinien wurde je nach Zellart und enthaltener Resistenz zusätzlich Hygromycin B in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, Puromycin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml bzw. beide in Endkonzentrationen von 100 µg/ml (Hygromycin B) respektive 2 µg/ml (Puromycin) hinzugefügt. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Alle 2 – 4 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wurde das alte Medium mit einer Seropipette entnommen und durch frisches, vorgewärmtes Kulturmedium ersetzt. Die Passage der Zellen erfolgte abhängig von der Zelldichte. Hierfür wurde mittels einer Seropipette das Medium aus der Kulturflasche entfernt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 3 – 4 ml *Phosphate buffered serum* (PBS) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben, dieses durch Schwenken gleichmäßig verteilt und die Zellen für 3 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurde die Zelllösung in 9 ml Kulturmedium resuspendiert. Abschließend wurde 1 ml der Zelllösung in der Flasche belassen und diese mit Kulturmedium wieder bis auf 10 ml aufgefüllt. Somit wurde eine 1:10-Verdünnung erreicht.

3.2.3 Auftauen von Zellen

Ein Kryo-Einfrierröhrchen mit den gewünschten Zellen wurde aus dem Lagerungsgefäß bei -80 °C entnommen und im Wasserbad bei 37 °C für max. 3 min aufgetaut. Währenddessen wurden 2 ml vorgewärmtes Kulturmedium in ein 15 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Die aufgetaute Zellsuspension wurde durch vorsichtiges Resuspendieren mit dem Kulturmedium im Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 200 g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Schließlich wurde das Zellpellet in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und die Suspension in eine vorgewärmte T75-Zellkulturflasche mit 10 ml Kulturmedium gegeben. Diese wurde abschließend weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.4 Einfrieren von Zellen

Vorbereitend wurde Kryomedium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nach dem Ablösen/Trypsinieren der einzufrierenden Zellen wurde die Suspension in ein 15 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde bei 200 g für 3 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 2 ml vorgewärmtem Kryomedium resuspendiert und 1 ml der Suspension in je ein spezielles Kryo-Einfrierröhrchen gegeben. Diese wurden im *Cryo 1 °C freezing container* über Nacht in Propanol bei -80 °C langsam gefroren und am Folgetag in flüssigen Stickstoff umgelagert.

3.2.5 Transiente Transfektion von Zellen mit TLR8-Konstrukten

3.2.5.1 Zellaussaat

Der Transfektionsvorgang dient dem Einbringen von DNA in Form von Plasmiden in Zellen. Dazu wurden die Zellen zuerst in gewünschter Dichte in 6-Well-Platten ausgesät. Das Medium wurde aus der T75-Zellkulturflasche entfernt und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben mit anschließender Inkubation bei 37 °C für 3 min. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion erfolgte die Resuspension der abgelösten Zellen in 9 – 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium.

Die Messung der Zelldichte erfolgte mittels Auszählung per Neubauer-Zählkammer. Die einzusäende Zellmenge wurde in einem Gesamtvolumen von 1.5 ml Kulturmedium in je einen Well der 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden dann für 12 – 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Ziel war eine Adhäsion der Zellen an den Boden der Wells. Tab. 3.2 zeigt die Anzahl auszusäender Zellen abhängig von der Zellart sowie deren gewünschte Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion.

Tab. 3.2: Übersicht über Zellzahl und -konfluenz bei transienten Transfektionen in 6-Well-Platten

Zellart	Ausgesäte Zellzahl	Gewünschte Konfluenz
HEK293	1.5 Mio.	50 – 80 %
HEK293T	0.6 Mio.	30 – 50 %
Luciferase-Reporterzellen	2 Mio.	50 – 80 %

3.2.5.2 *Liposomenvermittelte Transfektion mittels Roti®-Fect-Reagenz*

Bei entsprechender Konfluenz der Zellen konnte die eigentliche Transfektion durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde *Roti®-Fect-Reagenz* eingesetzt: Unter sterilen Bedingungen wurden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß 100 µl DMEM mit 2.5 µl *Roti®-Fect-Reagenz* gemischt. In einem weiteren 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden 100 µl DMEM mit 1 µg DNA versetzt. Im Anschluss erfolgten die Gabe der *Roti®-Fect*-haltigen Lösung zur DNA-Lösung und die Inkubation des Gemischs bei Raumtemperatur für 20 min.

An den in eine 6-Well-Platte eingesäten Zellen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen: Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit je 800 µl PBS gewaschen und 1.5 ml antibiotikafreies Kulturmedium (90 % DMEM, 10 % FKS) in die einzelnen Wells gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit des DNA-*Roti®-Fect*-Gemischs wurde dieses tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 12 – 18 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-erfolgte ein erneuter Mediumwechsel auf antibiotikahaltiges Kulturmedium (89 % DMEM, 10 % FKS, 1 % Pen/Strep)

3.2.5.3 *Transfektion mittels Calciumchlorid-Protokoll*

Das Vorgehen entsprechend des Calciumchlorid (CaCl₂)-Protokolls ist dem des *Roti®-Fect*-Protokolls sehr ähnlich. Unter sterilen Bedingungen wurden in 1.5 ml Reaktionsgefäßen 75 µl 2x N,N-Bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES)-Puffer, 75 µl 0.25 M CaCl₂-Lösung und 1.5 µg DNA gemischt und für 10–15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde ein Mediumwechsel bei den in einer 6-Well-Platte ausgesäten Zellen vorgenommen: Die Zellen wurden mit 800 µl PBS gewaschen und anschließend 1.5 ml antibiotikafreies Medium (90 % DMEM, 10 % FKS) in die einzelnen Wells gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die DNA-haltige Transfektionslösung tropfenweise zu den zu transfizierenden Zellen gegeben. Nach 12 – 18 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte ein erneuter Mediumwechsel hin zu antibiotikahaltigem Kulturmedium (89 % DMEM, 10 % FKS, 1 % Pen/Strep).

3.2.6 Generierung stabiler Zelllinien

Es wurden zwei Zelllinien generiert, die den stabil ins Genom integrierten TLR8-Wildtyp bzw. TLR5/8 tragen. Die Arbeiten wurden unter S2-Bedingungen durch Frau Dr. S. Reuter durchgeführt. Der Prozess zur Generierung stabiler Zelllinien gliedert sich in fünf Abschnitte. Im ersten Schritt wurde der gewünschte TLR in den lentiviralen

Expressionsvektor pCDH_CMV_MCS_EF1_Puro kloniert: Die Isolation von TLR8 bzw. TLR5/8 erfolgte per einstündigem Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und ApaI bei 37 °C. Der lentivirale Expressionsvektor wurde mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend per Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma QIAGEN entsprechend des Herstellerprotokolls isoliert. Anschließend lagen Insert und Vektor in Lösung vor, sodass deren Ligation mittels *T4 DNA-Ligase* entsprechend des Herstellerprotokolls erfolgen konnte. Im zweiten Schritt wurden Lentiviren erzeugt, die jeweils den gewünschten Rezeptor tragen. Dazu wurden je 1.4 Mio. *HEK293T*-Zellen in 3 ml Kulturmedium in Schalen von 6 cm Durchmesser ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei einer Konfluenz der Zellen von 70 – 80 % erfolgte die Transfektion der Zellen entsprechend des unter Punkt 3.2.5.3 beschriebenen CaCl₂-Protokolls. Der Vorgang wird hier für eine Schale beschrieben.

Folgende Plasmide wurden in den angegebenen Mengen verwendet: Der lentivirale Expressionsvektor pCDH_CMV_MCS_EF1_Puro mit dem eingefügten TLR (2 µg) sowie die Verpackungsplasmide pMDL (2 µg), pRSV (0.4 µg) und pVSV (1 µg). Alle Plasmide wurden in den angegebenen Mengen in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß gemischt, anschließend jeweils 150 µl 0.25 M CaCl₂-Lösung und 2x BES zugegeben und die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der eingesäten Zellen abgesaugt, diese einmalig mit 3 ml PBS gewaschen und schließlich 3 ml antibiotikafreies Kulturmedium (90 % DMEM, 10 % FKS) sowie die gesamte DNA-Lösung hinzugefügt. Schließlich inkubierten die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 14 – 18 h wurde das Transfektionsmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit DMEM gewaschen und erneut 3 ml antibiotikafreies Kulturmedium hinzugegeben. Nach 48 h wurde der die Lentiviren enthaltende Überstand abgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde erneut antibiotikafreies Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Der Überstand wurde 3 – 4 Mal im Abstand von 24 h geerntet. Der abgenommene Überstand wurde durch eine Spritze mit Vorsatzfilter (Porengröße 0.45 µm) filtriert und in Aliquots von 1 ml bei -80 °C in Schraubgewinderöhrchen eingefroren. Die Zellen wurden anschließend entsorgt. Im dritten Schritt erfolgte die Infektion von Luciferase-Reporterzellen mit den lentivirushaltigen Überständen. Dazu wurden 50.000 Zellen je Well in eine 24-Well-Platte in Kulturmedium mit Hygromycin B eingesät. Die Platte wurde dann über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine Adhäsion der

Zellen zu ermöglichen. Am Folgetag wurden je 500 µl der aufgetauten, lentivirenhaltigen Lösung in jedes Well gegeben und die Platte anschließend für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgten die Abnahme des Überstands, die erneute Zugabe von 500 µl virenhaltiger Lösung und erneute Inkubation der Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂. Am Folgetag wurden ohne Abnahme des alten Mediums 500 µl der virenhaltigen Lösung für weitere 6 h in jedes Well gegeben. Danach erfolgte ein Mediumwechsel zu Kulturmedium, ergänzt mit Selektionsantibiotika in folgenden Endkonzentrationen: Hygromycin (100 µg/ml, zum Erhalt der bereits bestehenden NF-κB-Reporterzellaktivität) und Puromycin (2 µg/ml zur Selektion der Zellen). Im weiteren Verlauf erfolgten die Kultivierung und bei ausreichender Konfluenz die Passage der Zellen wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben. Schließlich erfolgte eine Integritätsprüfung der zwei generierten Zelllinien hinsichtlich des Erfolgs der stabilen Transfektionen mittels *Quantitative real-time PCR* (rt-PCR).

3.3 Stimulationsversuche unter Verwendung eines Luciferase-Reporter-Systems

3.3.1 Grundlagen des Luciferase-Reporter-Systems

Das Prinzip eines Luciferase-Reporter-Assays besteht darin, dass in Zellen infolge einer Rezeptoraktivierung der Promotor eines Luciferasegens aktiviert und dieses somit verstärkt exprimiert wird. Die Luciferase ist in der Lage, Luciferin in Gegenwart von Sauerstoff und verschiedenen Kofaktoren zu oxidieren. Dabei wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, welches gemessen werden kann und einen Rückschluss auf die Aktivierungsstärke der Signalkaskade erlaubt (Brasier et al. 1989).

Wir führten Experimente durch, bei denen TLR8 bzw. die verschiedenen TLR8-Konstrukte in Luciferase-Reporterzellen exprimiert und mittels eines synthetischen Agonisten (R848) aktiviert wurden. Die Zellen enthalten alle Elemente der TLR-Signalkaskade. Zusätzlich enthält das Genom der Zellen einen NF-κB-empfindlichen Promotor, welcher das Gen für die *Firefly*-Luciferase kontrolliert. Im Folgenden wird der Aktivierungsmechanismus der Luciferase beschrieben:

Infolge Ligandenbindung kommt es zur Aktivierung des TLRs, welche in der Rekrutierung des Adapterproteins MyD88 sowie der Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade

mündet. Hierdurch bedingt wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Dieser transloziert in den Zellkern und bindet dort an NF- κ B-spezifische DNA-Sequenzen im diesbezüglich empfindlichen Promotor. Mit Aktivierung des Promotors erfolgt eine verstärkte Produktion der *Firefly*-Luciferase, welche das im Kulturmedium vorhandene Luciferin unter Emission von Licht der Wellenlänge 562 nm oxidiert (Dyer et al. 2000).

3.3.2 Aktivierung stabiler TLR8- bzw. TLR5/8-Zelllinien mit R848

Für die Stimulationsversuche wurden je 100.000 der Luciferase-Reporterzellen in je 140 μ l Luciferinmedium in die Wells einer 96-Well-Platte eingesät. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert, um eine Adhäsion der Zellen an den Plattenboden zu gewährleisten.

Vor Beginn der Messung wurde die 96-Well-Platte mittels Aufbringens einer *Optical adhesive cover*-Folie unter Verwendung eines *ALPSTM 50U*-Schweißgeräts versiegelt. Die Messung selbst erfolgte in einem *Luminoskan RS*-Luminometer, zuerst ohne Stimulation für mindestens eine Stunde (Vorlauf). Danach erfolgte die TLR-Aktivierung mittels Zugabe des TLR8-Agonisten R848 in gewünschter Dosis, gelöst in Luciferinmedium mit einem Gesamtvolumen von 10 μ l. Hierfür wurde die Versiegelungsfolie vorübergehend entfernt.

Stabile Zelllinien wurden mit einer R848-Endkonzentration bis 10 μ g/ml, transient transfizierte Zellen mit einer R848-Endkonzentration von 30 μ g/ml stimuliert. Die Messung erfolgte über mindestens 12 h.

3.3.3 Messung und Auswertung der Stimulationsversuche

Während eines Stimulationsversuchs wurde in regelmäßigen Abständen das Biolumineszenzsignal eines jeden Wells der 96-Well-Platte für 15 s bei 30 °C gemessen. Über die Zeit wurde so für jeden Well der Verlauf des jeweiligen Biolumineszenzsignals dokumentiert. Dieses korreliert mit der Produktionsrate der Luciferase. Die Daten wurden automatisiert in eine Datenbank mittels einer speziell hierfür programmierten Software eingetragen (Mrowka et al. 2008).

Die Basisexpression der Luciferase variierte zwischen den einzelnen Wells, woraus unterschiedliche Ausgangs-Biolumineszenzintensitäten resultierten. Die Ursache dafür waren u.a. leichte Abweichungen in der ausgesäten Zellzahl je Well. Um eine Vergleichbarkeit der gemessenen Biolumineszenzsignale zu gewährleisten, erfolgte daher

die Normierung aller Messwerte. Hierfür wurde zuerst für jeden Well der Mittelwert aller gemessenen Biolumineszenzsignale während der letzten Stunde des Vorlaufs berechnet. Dieser entspricht dem jeweiligen Basissignal. Anschließend wurden alle gemessenen Werte nach Aktivierung der Zellen durch dieses Basissignal geteilt. Im Ergebnis erhielt man die relative Luciferaseaktivität. Diese spiegelt die Luciferaseaktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt im Vergleich zur Basisexpression der Luciferase wider.

3.3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der gemessenen Biolumineszenzsignale wurde die *nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten* nach Dr. E. Brunner und Dr. F. Langer angewendet (Brunner et al. 2002). Alle Analysen erfolgten nach dem *F2-LD-F1*-Modell. Mögliche Einflussfaktoren waren zum einen die Zellart, welche in den meisten Fällen durch die Expression unterschiedlicher TLR-Konstrukte bei identischer Zelllinie bedingt war, zum anderen die Stimulation der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des R848. Für die eigentliche Auswertung wurde das Statistikprogramm R inklusive des Packages *npard* genutzt (Noguchi et al. 2012, R-Core-Team 2017). Die erhaltenen p-Werte waren vom Typ ANOVA.

3.4 Optische Lokalisierung der TLR8-Konstrukte

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein *AxioObserver Z1*-Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss verwendet. Die bei der Aufnahme zu verwendenden Belichtungszeiten legte die Software selbstständig fest. Die mikroskopische Beobachtung aller TLRs erfolgte indirekt über an die jeweiligen TIR-Domänen gekoppelte Fluoreszenzproteine (YFP oder CFP). Alle TLR8-Konstrukte sowie der TLR8-Wildtyp wurden so hinsichtlich des Transfektionserfolgs sowie der Lokalisation in der Zelle evaluiert. Zu diesem Zweck wurden die Well-Platten mit den Zellen in einen passenden Objektträger des Mikroskops gesetzt. So konnten die Zellen im vitalen Zustand mikroskopiert werden. Es wurden von einem Bildausschnitt jeweils Durchlichtaufnahmen, Aufnahmen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie des Fluoreszenzfarbstoffs mCherry angefertigt. YFP- bzw. CFP-Aufnahmen zeigten die an die TLR8-Konstrukte gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe. MCherry-Aufnahmen dienten als Kontrolle für eine unspezifische Fluoreszenz der Zellen. Im Auswerteprogramm ZEN der Firma Zeiss wurde jedem der Fluoreszenzfarbstoffe eine Falschfarbe zugeordnet, um sie in den Aufnahmen besser kenntlich zu machen.

3.5 Screening zur TLR8- bzw. TLR5/8-Aktivierung durch Wirkstoffe zugelassener Medikamente

3.5.1 Stimulationsversuche mit einer Medikamentenbibliothek

Um zu überprüfen, ob der TLR5/8 durch Medikamente aktiviert werden kann, wurde ein Screening mit den von der FDA zugelassenen Wirkstoffe durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden je 20.000 Zellen der stabilen TLR5/8-Reporterzelllinie bzw. TLR4/MD2/CD14-Zellen als Kontrolle in je 25 µl Luciferinmedium in die Wells von 384-Well-Platten eingesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Diese von der Firma *Enzo Life Sciences* hergestellten Platten trugen in jedem Well einen medikamentösen Wirkstoff. Die Medikamente waren auf insgesamt drei 384 Well-Platten verteilt. Insgesamt erfolgten je Medikament zwei Messungen: an der chimären TLR5/8-Zelllinie und an der TLR4-Kontroll-Zelllinie. Für die Auswertung wurden für jeden Well die Mittelwerte der Biolumineszenzsignale der ersten Messstunde sowie des Zeitabschnitts bis 22 h nach Messbeginn berechnet und das Verhältnis beider gebildet. Der Zeitabschnitt während der ersten Messstunde entspricht annähernd der Basisexpression der Luciferase, der spätere Abschnitt korreliert mit einer etwaigen Änderung der Luciferaseaktivität. Anschließend wurde für jedes dieser Verhältnisse eine z-Transformation durchgeführt. Dadurch wurde die Zufallsvariable so verändert, dass sie den Erwartungswert null und die Varianz eins erhält. Ziel dieses Verfahrens ist es, nicht-normalverteilte Zufallsvariablen, also in diesem Fall die Stimulation von TLR5/8 und TLR4 durch denselben Wirkstoff, vergleichen zu können (Bortz und Schuster 2011). Zu diesem Zweck wurde der transformierte TLR5/8-Wert vom transformierten Kontrollwert subtrahiert. Dadurch wurde schließlich ein Wert erhalten, dessen Höhe die Veränderung der Luciferaseaktivität und damit indirekt die Stärke der Aktivierung des TLR5/8 im Vergleich zum TLR4 angibt.

3.5.2 Stimulationsversuche mit ausgewählten Substanzen

Es wurden je ca. 100.000 Zellen der stabilen TLR8- bzw. TLR5/8-Zelllinie sowie der Luciferase-Reporterzelllinie als Kontrolle in je 140 µl Luciferinmedium in die Wells einer 96-Well-Platte eingesät. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen nach einem etwa zweistündigen Vorlauf mit Imatinib, Vorinostat, Nitazoxanid und Posaconazol (Sigma Aldrich, Endkonzentration je 1 mMol/l) stimuliert. Der grundsätzliche Ablauf entsprach dem in Punkt 3.3 dargestellten Ablauf.

4 Ergebnisse

4.1 Potentielle Lokalisierungssequenzen von TLR8

Der TLR8-Wildtyp ist typischerweise in endosomalen Membranen lokalisiert (Shah et al. 2014). Ein Ziel dieser Arbeit war die Relokalisierung des Rezeptors in die äußere Zellmembran. Zu diesem Zweck wurden zwei Ansätze gewählt: Zum einen wurden potentielle, endosomale Lokalisierungssequenzen innerhalb der ICD von TLR8 identifiziert. Im Anschluss wurden TLR8-Konstrukte generiert, in denen diese Sequenzen mutiert oder deletiert wurden. Zum anderen wurde ein chimärer Ansatz verfolgt, bei dem die ECD und TMD von TLR8 mit der ICD von TLR5 gekoppelt wurden. Als Positivkontrolle wurde ein TLR8-Konstrukt mit deletierter TIR-Domäne kloniert (Itoh et al. 2011). Abb. 4.1 zeigt schematisch den Aufbau der verschiedenen Konstrukte.

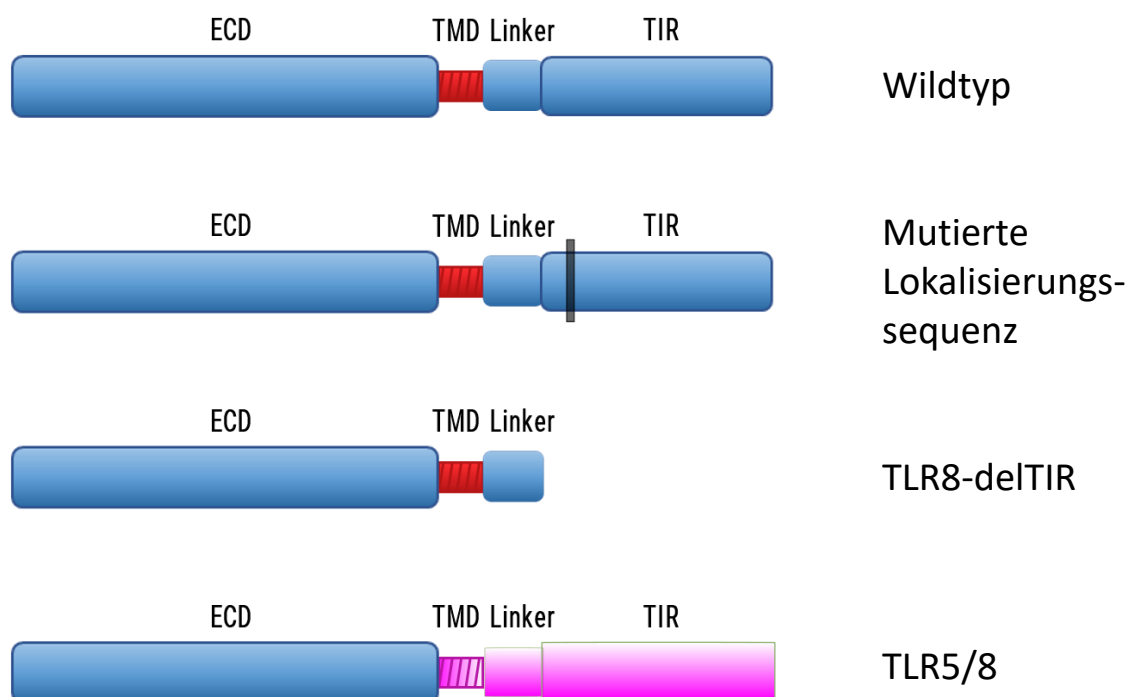


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Typen von TLR8-Mutanten

Blaue und rote Anteile der dargestellten Konstrukte stammen von TLR8, pinke Anteile stammen von TLR5. Linker und TIR-Domäne stellen zusammen die ICD dar. a) TLR8-Wildtyp, b) TLR8-Konstrukt mit mutierter, potentieller Lokalisierungssequenz (schwarze Linie) innerhalb der ICD, c) Positivkontrolle mit deletierter TIR-Domäne, d) Chimäres TLR5/8-Konstrukt aus ECD von TLR8 sowie TMD und ICD von TLR5.

Mittels Literaturrecherche wurde mehrere Grundformen endosomaler Lokalisierungssequenzen identifiziert. Diese werden in Tab. 4.1 dargestellt.

Tab. 4.1: Übersicht über die Grundstruktur potentieller Lokalisierungssequenzen

Für die Darstellung der Aminosäuren wurde der IUPAC-Code verwendet: D: Asparaginsäure, E: Glutaminsäure, G: Glycin, I: Isoleucin, L: Leucin, N: Asparagin, P: Prolin, Y: Tyrosin. X: beliebige AS, Ø: hydrophobe AS (Bonifacino und Traub 2003, Trowbridge et al. 1993).

	Aminosäuresequenz
Tyrosinbasierende Sequenz	YXXØ NPXY
Dileucinbasierende Sequenzen	[DE]XXXL[LI] DXXLL

Gemäß Literaturrecherche ermittelte Grundmotive für endosomale Lokalisierungssequenzen wurden mit der Aminosäuresequenz der ICD von TLR8 verglichen. Dabei wurden insgesamt fünf potentielle Lokalisierungssequenzen identifiziert. Die Lokalisierung dieser Sequenzen innerhalb des TLR8 wird in Abb. 4.2 veranschaulicht.

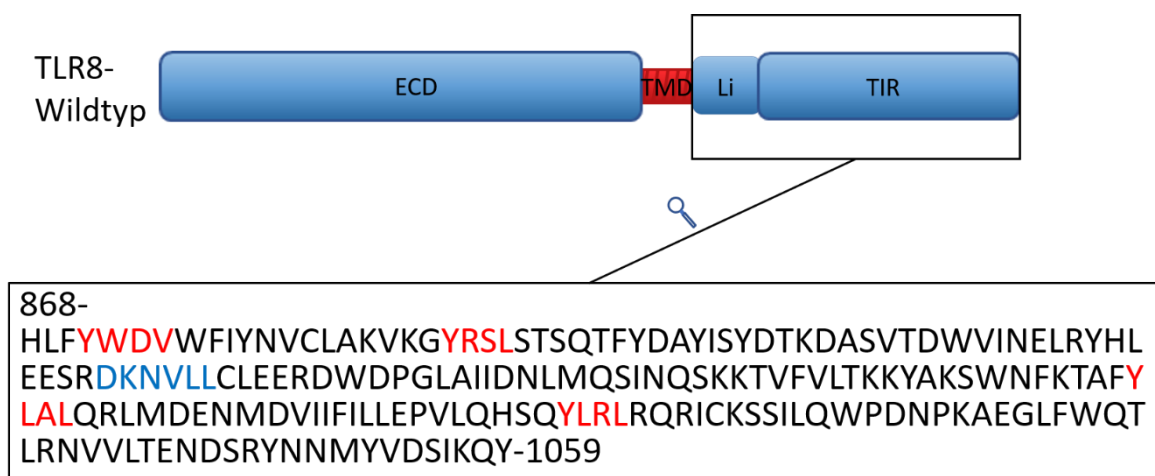


Abb. 4.2: Schematische Darstellung von TLR8 mit Hervorhebung potentieller Lokalisierungssequenzen

Oben: schematische Darstellung des TLR8-Wildtyps. Linker (Li) und TIR-Domäne (TIR) bilden zusammen die intrazelluläre Domäne (ICD, Aminosäuren 868 – 1059). Hier wurden literaturbasiert insgesamt fünf potentielle Lokalisierungssequenzen identifiziert. Diese sind in der Sequenzdarstellung (unten) farblich hervorgehoben (rot: Tyrosin-basierend, blau: Dileucin-basierend). Es wurde der IUPAC-Code für Aminosäuren verwendet: A: Alanin, D: Asparaginsäure, K: Lysin, L: Leucin, N: Asparagin, R: Arginin, S: Serin, V: Valin, Y: Tyrosin.

Des Weiteren wurde mittels bioinformatischer Analyse mit *R* nach einer Häufung von Peptidsequenzen, bestehend aus vier Aminosäuren, innerhalb der Aminosäuresequenzen aller endosomalen Proteine gesucht (Daten nicht dargestellt, Programm geschrieben durch Prof. Dr. Ralf Mrowka, Experimentelle Nephrologie, Universitätsklinikum Jena, R-Core Team 2017). Diese wurden mit den gemäß der Literaturrecherche identifizierten, potentiellen Lokalisierungssequenzen von TLR8 verglichen. Die bereits gemäß Literaturrecherche identifizierte, potentielle Lokalisierungssequenz YWDV (Aminosäuren 871 – 874) kam unter den gebildeten Peptidsequenzen prozentual besonders gehäuft vor. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Sequenz für die endosomale Lokalisation von TLR8 von Bedeutung ist.

Zur Überprüfung der potentiellen Aminosäuresequenzen wurden zum einen TLR8-Mutanten generiert, in denen jeweils die gesamte, potentielle Lokalisierungssequenz deletiert wurde. Zum anderen wurden Konstrukte generiert, in denen das führende Y (Tyrosin) der Grundform YXXØ zu A (Alanin) mutiert wurde, da es für die Funktion der Lokalisierungssequenz unverzichtbar ist (Bonifacino und Traub 2003). Eine Zuordnung der generierten TLR8-Mutanten zu den einzelnen Sequenzen wird in Tab. 3.1 im Methodenteil dargestellt.

4.2 Stimulation von Luciferase-Reporterzellen mit transienter Expression von TLR8-Mutanten

4.2.1 Zeitabhängiger Aktivierungsverlauf infolge Stimulation durch R848

Alle TLR8-Konstrukte wurden transient in Luciferase-Reporterzellen transfiziert. Hiermit wurde das Aktivierungsverhalten der Konstrukte infolge Stimulation durch R848 überprüft. Bei den Luciferase-Reporterzellen handelt es sich um Abkömmlinge von HEK293-Zellen, welche neben den für die TLR-Signalkaskade notwendigen Proteinen über eine stabil ins Genom integrierte, NF- κ B-abhängige *Firefly*-Luciferase verfügen. TLRs hingegen werden nicht spontan exprimiert. Weitere Informationen zur Zelllinie werden unter Punkt 3.3.1 beschrieben. Diese Zelllinie war im Labor bereits im Rahmen der Nutzung zellbasierter Assays etabliert (Herold 2012).

Alle TLR8-Konstrukte wurden mittels des synthetischen TLR8-Agonisten R848 ($c = 30 \mu\text{g/ml}$) aktiviert. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade, welche in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und via vermehrter Produktion der *Firefly*-Luciferase in der Umsetzung des im Kulturmedium enthaltenen Luciferins u.a. zu Licht mündet (de Wet et al. 1987). Die Lichtstärke wurde dabei über die Zeit gemessen. Sie korreliert mit der Produktion der Luciferase und kann somit als Maß für die Aktivierungsstärke des jeweiligen TLR8-Konstrukts interpretiert werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die gemessenen Luciferaseaktivitäten normiert: Zu diesem Zweck wurden die gemessenen Werte nach Stimulation durch die Basis-Luciferaseaktivität geteilt. Diese entspricht dem Mittelwert aller gemessenen Luciferaseaktivitäten über eine Zeitspanne von einer Stunde vor R848-Zugabe. Tab. 3.1 zeigt eine Übersicht über die generierten TLR8-Konstrukte mit Mutation bzw. Deletion potentieller Lokalisierungssequenzen innerhalb der ICD. Bei TLR5/8 handelt es sich um einen chimären TLR, bestehend aus der ECD von TLR8 sowie der TMD und ICD von TLR5. Die jeweiligen Stimulationskurven mit den relativen Luciferaseaktivitäten sind in der Abb. 4.3 dargestellt.

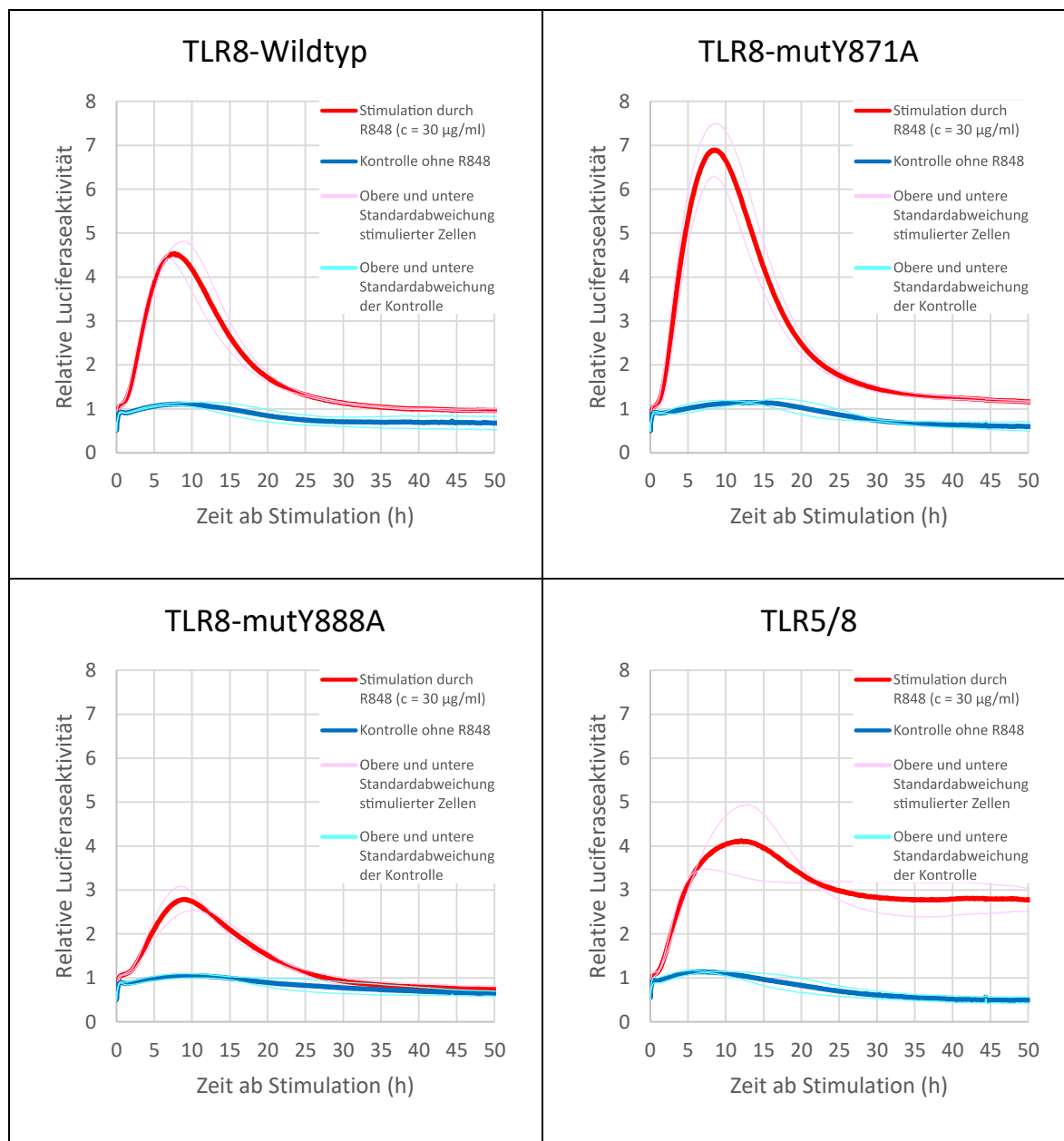


Abb. 4.3, Teil A: Zeitlicher Verlauf der relativen Luciferaseintensität von Luciferase-Reporterzellen mit Expression von durch R848 stimulierbaren TLR8-Konstrukten

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der relativen Luciferaseaktivität einschließlich der jeweiligen Standardabweichungen von Luciferase-Reporterzellen, welche den TLR8-Wildtyp bzw. die genannten TLR8-Mutanten transient exprimieren. Die Zellen wurden mit R848 in einer Endkonzentration von 30 µg/ml (rote Kurve, n=4) stimuliert. Die jeweiligen Kontrollen ohne R848-Stimulation sind blau dargestellt (n=4). Zum Erhalt der relativen Luciferaseaktivität wurden die gemessenen Lichtintensitäten normiert, d.h. durch die Basisluciferaseaktivität geteilt. Die Stimulation fand zum Zeitpunkt 0 statt. Statistik: Einfluss der Stimulation mit R848 ($p=2.31 \cdot 10^{-11}$), Einfluss der Zellart ($p=4.40 \cdot 10^{-46}$), Einfluss der Zeit ($p=1.94 \cdot 10^{-57}$).

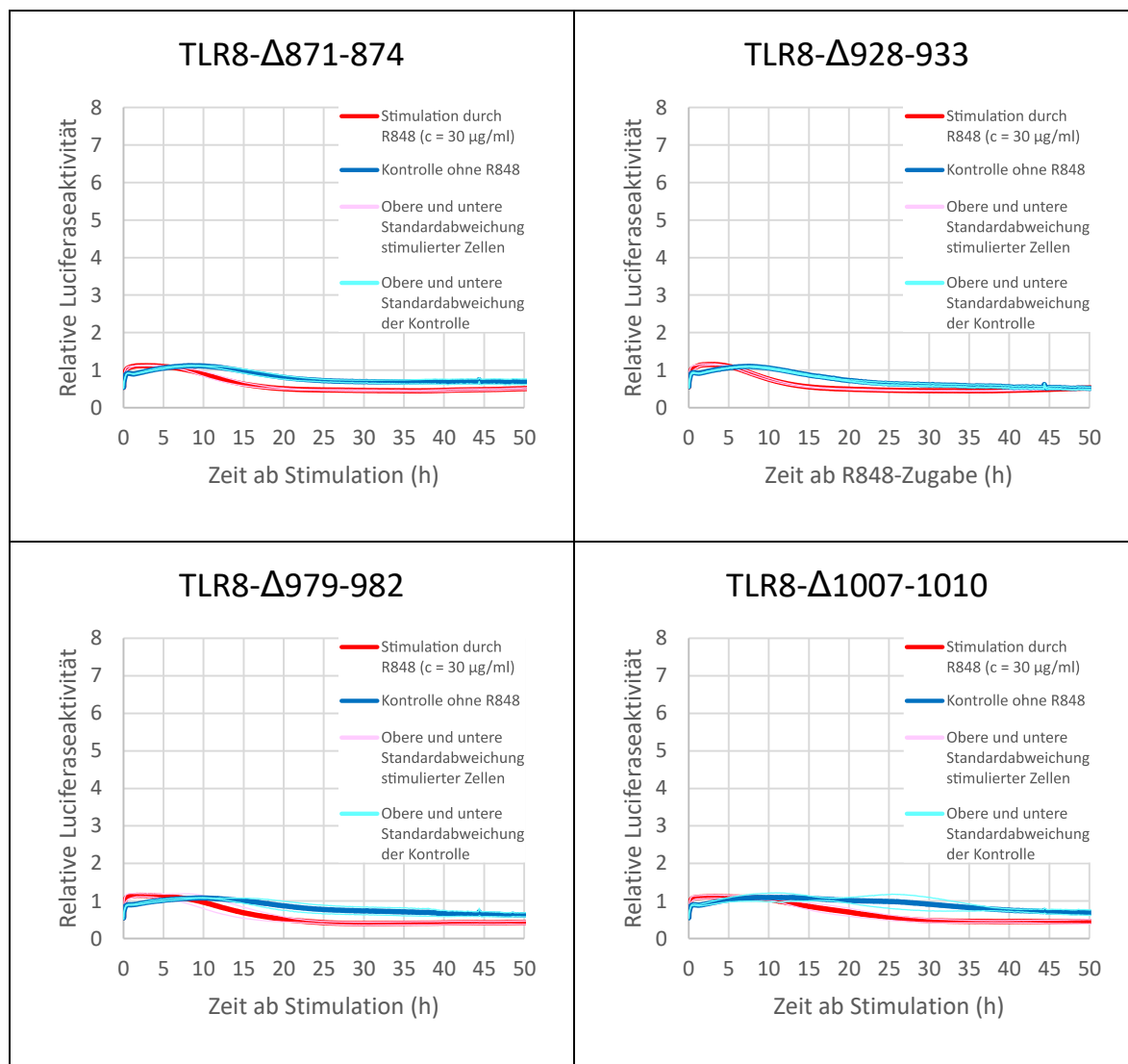


Abb. 4.3, Teil B: Zeitlicher Verlauf der relativen Luciferaseintensität von Luciferase-Reporterzellen mit Expression von durch R848 nicht-stimulierbaren TLR8-Konstrukten
 Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der relativen Luciferaseaktivität einschließlich der jeweiligen Standardabweichungen von Luciferase-Reporterzellen, welche die genannten TLR8-Mutanten transient exprimieren. Die Zellen wurden mit R848 in einer Endkonzentration von 30 µg/ml (rote Kurve, n=4) stimuliert. Die jeweiligen Kontrollen ohne R848-Stimulation sind blau dargestellt (n=4). Zum Erhalt der relativen Luciferaseaktivität wurden die gemessenen Lichtintensitäten normiert, d.h. durch die Basisluciferaseaktivität geteilt. Die Stimulation fand zum Zeitpunkt 0 statt. Statistik: Einfluss der Stimulation mit R848 ($p=2.31 \cdot 10^{-11}$), Einfluss der Zellart ($p=4.40 \cdot 10^{-46}$), Einfluss der Zeit ($p=1.94 \cdot 10^{-57}$).

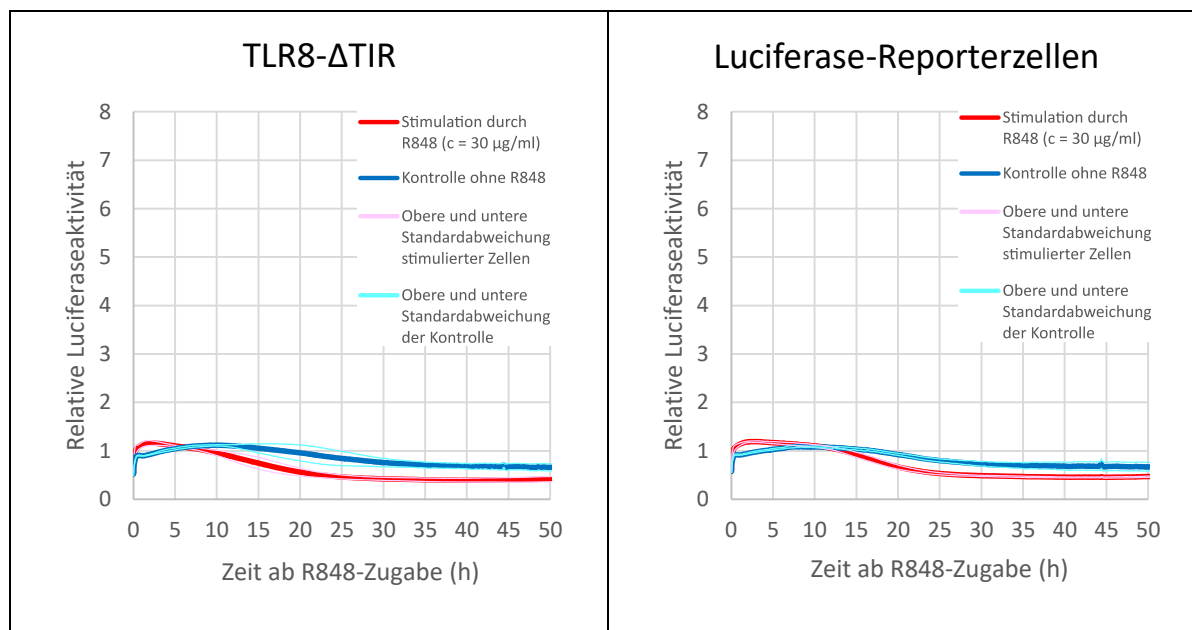


Abb. 4.3, Teil C: Zeitlicher Verlauf der relativen Luciferaseintensität von Luciferase-Reporterzellen mit transienter Expression der Negativkontrollen infolge Stimulation durch R848

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der relativen Luciferaseaktivität einschließlich der jeweiligen Standardabweichungen von Luciferase-Reporterzellen, welche den TLR8-Wildtyp bzw. die genannten TLR8-Mutanten transient exprimieren. Die Zellen wurden mit R848 in einer Endkonzentration von 30 µg/ml (rote Kurve, $n=4$) stimuliert. Die jeweiligen Kontrollen ohne R848-Stimulation sind blau dargestellt ($n=4$). Zum Erhalt der relativen Luciferaseaktivität wurden die gemessenen Lichtintensitäten normiert, d.h. durch die Basisluciferaseaktivität geteilt. Die Stimulation fand zum Zeitpunkt 0 statt. Bei TLR8-ΔTIR handelt es sich um ein TLR8-Konstrukt mit deletierter TIR-Domäne. Dieses soll in der äußeren Zellmembran lokalisiert sein (Itoh et al. 2011). Untransfizierte Luciferasezellen exprimieren kein TLR8-Konstrukt und dienen als Negativkontrolle. Statistik: Einfluss der Stimulation mit R848 ($p=2.31 \cdot 10^{-11}$), Einfluss der Zellart ($p=4.40 \cdot 10^{-46}$), Einfluss der Zeit ($p=1.94 \cdot 10^{-57}$).

Die Abb. 4.3 zeigt in jedem Diagramm die relativen Luciferaseaktivitäten einschließlich der jeweiligen Standardabweichungen eines TLR8-Konstrukts nach Stimulation mit dem synthetischen TLR8-Agonisten R848 über eine Zeitspanne von 50 h. Die R848-Endkonzentration beträgt stets 30 µg/ml (rote Kurve), die R848-Konzentration der jeweils zugehörigen Kontrolle immer 0 µg/ml (blaue Kurve).

Die Aktivierung mit R848 fand jeweils zum Zeitpunkt null statt. Kurze Zeit danach weisen alle Kurven einen leichten Abfall der relativen Luciferaseaktivität unter den Initialwert von 1 auf, welcher sich schnell erholt. Eine relative Luciferaseaktivität von 1 entspricht gleichzeitig der Basis-Luciferaseaktivität der Zellen. Der vorübergehende Abfall ist wahrscheinlich bedingt durch das Abkühlen der Zellen unter 37 °C während des Einbringens des R848 bei Raumtemperatur.

Im Anschluss kommt es je nach TLR8-Konstrukt zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Anstieg der relativen Luciferaseaktivität. Nach Erreichen eines Maximums folgt schließlich ein Abfall der relativen Luciferaseaktivität auf ein Zielniveau, dessen Höhe vom jeweiligen TLR8-Konstrukt abhängig ist.

Bei den TLR8-Rezeptoren/Mutanten TLR8-Wildtyp, TLR8-mutY871A, TLR5/8 sowie TLR8-mutY888A kommt es infolge Aktivierung durch R848 zu einem deutlichen Anstieg der relativen Luciferaseaktivitäten. Die maximale Aktivität zeigt das Konstrukt TLR8-mutY871A, gefolgt von TLR8-Wildtyp, TLR5/8 und schließlich TLR8-mutY888A. Die maximale Aktivität von TLR8-mutY871A erreicht die etwa 6.9x Basis-Luciferaseaktivität, die des TLR8-Wildtyps TLR8-Wildtyp die 4.5x Basis-Luciferaseaktivität, die von TLR5/8 die 4.1x Basis-Luciferaseaktivität und die von TLR8-mutY888A die 2.8x Basis-Luciferaseaktivität. Somit führt die Zugabe von R848 in einer Konzentration von 30 µg/ml zu einer 1.5x stärkeren Aktivierung von TLR8-mutY871A als vom TLR8-Wildtyp. Bei TLR5/8 und TLR8-mutY888A ist die Aktivierbarkeit durch R848 schwächer als beim TLR8-Wildtyp. Zu erwähnen ist, dass TLR5/8 jedoch eine geringere Schwelle zur Aktivierbarkeit durch R848 aufweist als der TLR8-Wildtyp, also bereits bei einer geringeren R848-Konzentration zu einer verstärkten Luciferaseaktivität führt (Daten nicht dargestellt).

Nach Erreichen des Maximums kommt es zu einem Rückgang der relativen Luciferaseaktivität. Nach ungefähr 30 h ist das Zielniveau erreicht. Dieses liegt bei TLR8-Wildtyp, TLR8-mutY871A und TLR8-mutY888A zwischen der 0.75x bis 1.5x entsprechenden Ausgangsaktivität. Bei TLR5/8 zeigt sich hingegen ein Verbleib der relativen Luciferaseaktivität im Bereich der 2.7 – 2.9x Ausgangsaktivität. Bei den Messungen der eben beschriebenen Konstrukte ist die relative Luciferaseaktivität der stimulierten Zellen stets höher als die Aktivität der zeitlich entsprechenden Kontrollmessungen. Folglich zeigt sich eine Aktivierbarkeit der Konstrukte durch den TLR8-Agonisten R848. Zusammenfassend ist diese beim TLR8-Konstrukt TLR8-mutY871A stärker ausgeprägt als beim TLR8-Wildtyp, bei TLR5/8 und TLR8-mutY888A hingegen schwächer ausgeprägt als beim TLR8-Wildtyp.

Auch die restlichen Konstrukte TLR8-Δ871-874, TLR8-ΔTIR, TLR8-Δ928-933, TLR8-Δ979-982 und TLR8-Δ1007-1010 sowie die Kontrolle mit untransfizierten Luciferase-Reporterzellen weisen zum Zeitpunkt null einen leichten Abfall der relativen Luciferaseaktivität unter 1 auf, welcher sich zügig erholt. Dies ist wiederum bedingt durch

ein passageres Abkühlen der Zellen während der Zugabe von R848. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Konstrukten kommt es jedoch nur zu einem minimalen Anstieg der relativen Luciferaseaktivität über die Basis-Luciferaseaktivität von 1 hinaus. Im Anschluss kommt es zu einem langsamen Abfall der relativen Luciferaseaktivität, welche sich abhängig vom Konstrukt nach 15 – 30 h auf ein Zielniveau unterhalb der Basis-Luciferaseaktivität einstellt. Bereits nach 5 – 10 h kommt es so zu einem Abfall der relativen Luciferaseaktivität der stimulierten Zellen unter diejenige der unstimulierten Kontrollzellen.

Insgesamt zeigt sich ein deutlicher Unterschied hinsichtlich des Verlaufs der relativen Luciferaseaktivitäten der TLR8-Konstrukte TLR8-Wildtyp, TLR8-mutY871A, TLR5/8 sowie TLR8-mutY888A im Vergleich zu den TLR8-Konstrukten TLR8- Δ 871-874, TLR- Δ 871-874+ Δ 888-891, TLR8- Δ TIR, TLR8- Δ 928-933, TLR8- Δ 979-982 und TLR8- Δ 1007-1010 infolge Stimulation durch R848. Bei ersteren, den Mutationskonstrukten, zeigt sich eine deutlich erhöhte, relative Luciferaseaktivität als bei Letzteren, den Deletionskonstrukten. Zudem besteht bei den Mutationskonstrukten eine deutlich erhöhte, relative Luciferaseintensität im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollmessungen bzw. zu nicht-TLR8-exprimierenden Luciferase-Reporterzellen. Somit zeigen sich die Konstrukte TLR8-mutY871A, TLR5/8 sowie TLR8-mutY888A funktionell mit erhaltener Aktivierbarkeit durch R848. Bei den Konstrukten TLR8- Δ 871-874, TLR- Δ 871-874+ Δ 888-891, TLR8- Δ TIR, TLR8- Δ 928-933, TLR8- Δ 979-982 und TLR8- Δ 1007-1010 zeigt sich jedoch ein nahezu identischer Verlauf der relativen Luciferaseaktivitäten im Vergleich zur jeweiligen Kontrollmessung sowie im Vergleich zum Verlauf der relativen Luciferaseaktivität nicht-TLR8-exprimierender Luciferase-Reporterzellen. Somit ist hier von einer reduzierten Funktion der TLR8-Konstrukte und damit abgeschwächter Aktivierbarkeit durch R848 auszugehen.

Zu erwähnen ist, dass sich bezüglich des Einflusses der Zeit, Stimulation durch R848 und Art des TLR8-Konstrukts auf den Verlauf der relativen Luciferaseaktivitäten hochsignifikante p-Werte zeigen. Diese sind stets deutlich kleiner als 0.05. Dies ist unabhängig davon, um welches TLR8-Konstrukt es sich handelt. Die hohe Signifikanz der Messungen ist möglicherweise bedingt durch die hohe Anzahl an Messpunkten, welche bei jeder Messung mehrere Tausend Stück beträgt. Sie besitzt jedoch wahrscheinlich nur eine reduzierte Aussagekraft hinsichtlich der biologischen Relevanz der Unterschiede zwischen Experiment und Kontrolle bei den Deletionskonstrukten.

4.2.2 Vergleich der Aktivierungsverläufe nach Stimulation mit R848

Unter den verschiedenen TLR8-Konstrukten wiesen neben dem TLR8-Wildtyp drei TLR8-Konstrukte eine positive Reaktion auf die Stimulation mit R848 auf (TLR8-mutY871A, TLR8-mutY888A, TLR5/8); bei allen anderen bestand kein relevanter Unterschied zur unstimulierten Kontrolle. Unter der Hypothese, dass ein in der äußeren Zellmembran befindliches TLR8-Konstrukt eine schnellere Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade veranlassen kann, sollte von diesen drei Konstrukten der zeitliche Verlauf des relativen Luciferaseaktivitätsanstiegs mit derjenigen vom TLR8-Wildtyp verglichen werden.

Die Abb. 4.4 zeigt den zeitlichen Verlauf der relativen Luciferaseaktivitäten von Luciferase-Reporterzellen mit transienter Expression von TLR8-Wildtyp, TLR8-mutY871A, TLR8-mutY888A und TLR5/8 nach Stimulation mit R848 in einer Endkonzentration von 30 µg/ml. Die Kurven sind aus Gründen der Übersichtlichkeit ohne Standardabweichungen dargestellt.

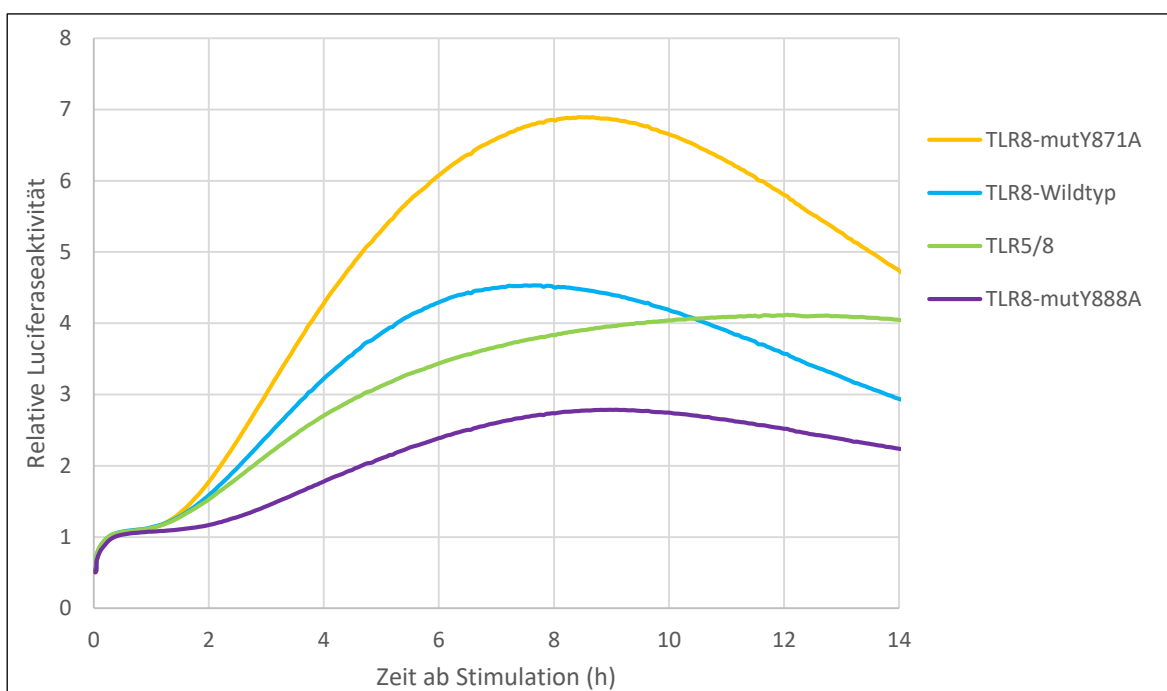


Abb. 4.4: Vergleich der Aktivierungsgeschwindigkeit von Luciferase-Reporterzellen mit transienter Expression von TLR8-Konstrukten nach R848-Stimulation

Das Diagramm zeigt vergleichend für Luciferase-Reporterzellen mit transienter Expression der angesprochenen TLR8-Konstrukte den zeitlichen Verlauf der relativen Luciferaseaktivität nach Stimulation mit R848 in einer Endkonzentration von 30 µg/ml. Es ist zu erkennen, dass TLR8-mutY871A den steilsten Anstieg aufweist, gefolgt vom TLR8-Wildtyp, TLR5/8 und TLR8-mutY888A. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Negativkontrolle sowie der jeweiligen Standardabweichungen verzichtet. Diese sind in der Abb. 4.3 dargestellt.

Der stärkste Anstieg zeigt sich für TLR8-mutY871A, gefolgt von TLR8-Wildtyp, TLR5/8 und TLR8-mutY888A. Im Verlauf bleibt mit einer Ausnahme auch die Abfolge der relativen Luciferaseaktivitäten erhalten: Nach ca. 10 h übertrifft TLR5/8 die Aktivität von TLR8-Wildtyp.

Somit führt die Aktivierung des Konstrukts TLR8-mutY871A am zügigsten zu einer Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade. Dies steht in Kongruenz mit der hier auch am höchsten ausgeprägten, maximalen, relativen Luciferaseaktivität im Vergleich zu TLR8-Wildtyp und den anderen TLR8-Mutationskonstrukten.

4.3 Stimulation von Luciferase-Reporterzellen mit stabiler Expression von TLR8 bzw. TLR5/8 mit R848

Für weitere Stimulationsexperimente sollte das chimäre Konstrukt TLR5/8 genutzt werden. Anhand der gesichteten Literatur schien es hier am wahrscheinlichsten, dass dieses Konstrukt in die äußere Zellmembran lokalisiert war (Nishiya und DeFranco 2004). Als jeweilige Kontrolle diente der TLR8-Wildtyp, welcher im weiteren Verlauf als TLR8 bezeichnet wird. Um eine bessere Vergleichbarkeit der durchzuführenden Experimente zu erreichen, wurden die TLRs stabil in Luciferase-Reporterzellen integriert. Hierbei handelt es sich um dieselben, auf HEK293-Zellen basierenden Luciferase-Reporterzellen, welche auch für die transienten Transfektionen genutzt worden waren. Infolge Stimulation mit R848 konnte auch hier eine NF- κ B-vermittelte Lichtemission über die Zeit gemessen werden.

Abb. 4.5 zeigt den zeitlichen Verlauf einschließlich Standardabweichungen der relativen Luciferaseaktivitäten beider Zelllinien sowie der Kontrollzelllinie nach Stimulation mit R848 in unterschiedlichen Konzentrationen (jeweils $n = 8$). Bei der Kontrollzelllinie handelt es sich um die ursprüngliche Luciferase-Reporterzelllinie ohne transfizierten TLR, welche zur Generierung der stabilen TLR8- bzw. TLR5/8-Zelllinien verwendet wurde. Die gemessenen Biolumineszenzsignale wurden dabei jeweils auf die Basis-Luciferaseaktivität, entsprechend dem Mittelwert aller Messwerte während der letzten Stunde vor R848-Zugabe, normiert.

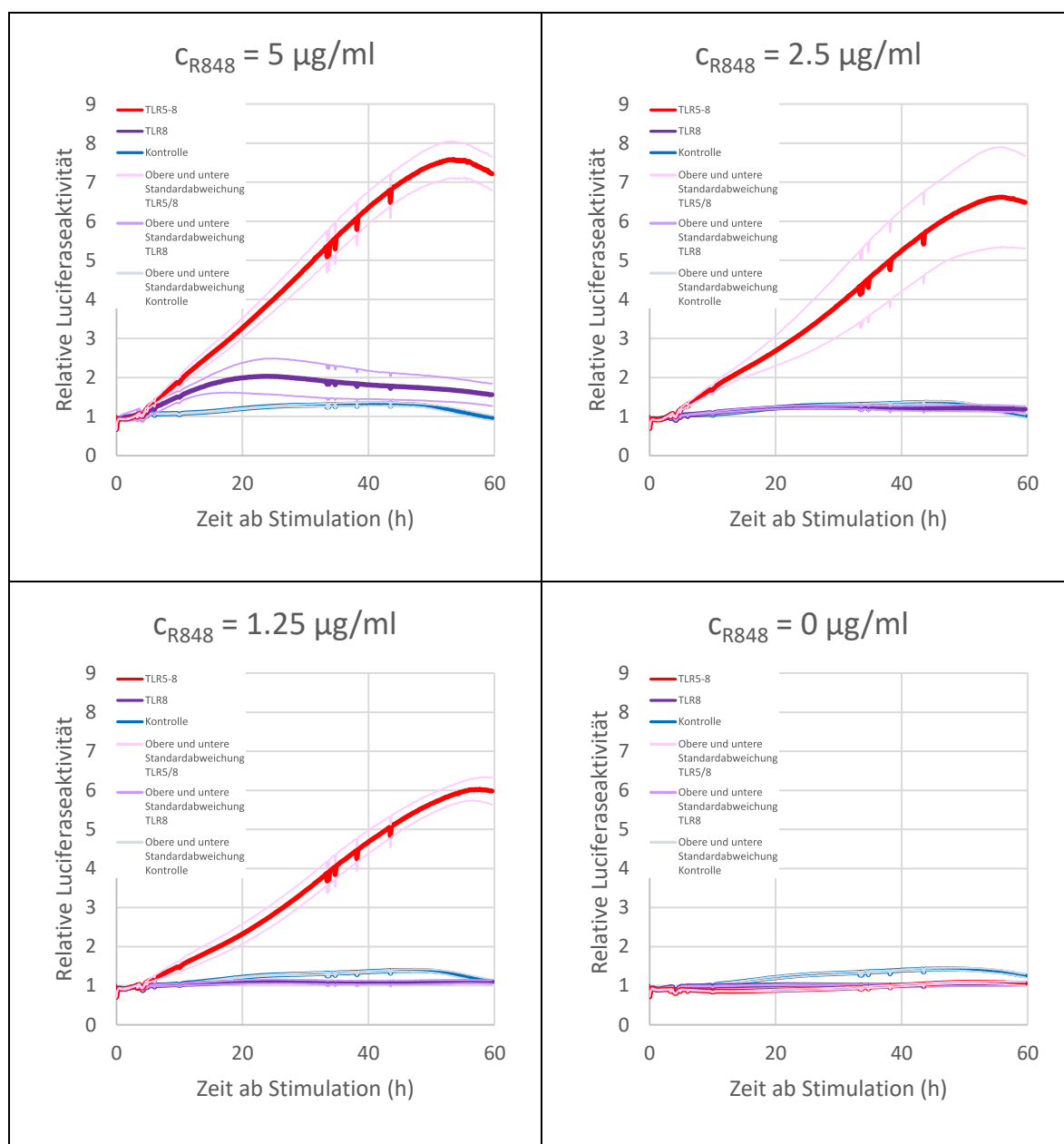


Abb. 4.5: Zeitabhängiger Verlauf der relativen Luciferaseaktivität in stabil TLR8- bzw. TLR5/8 exprimierenden Luciferase-Reporterzellen infolge Stimulation mit R848 in unterschiedlichen Konzentrationen

Die unterschiedlichen Graphen zeigen den zeitlichen Verlauf der relativen Luciferaseaktivität von Luciferase-Reporterzellen mit stabiler Expression von TLR5/8 (rote Kurven) bzw. TLR8 (lila Kurven) sowie der Kontrollen (Luciferase-Reporterzellen, blaue Kurven) nach Stimulation mit R848 in unterschiedlichen Konzentrationen. Über die Ausprägung der relativen Luciferaseaktivität kann quantitativ auf die Aktivierung des NF- κ B-Systems rückgeschlossen werden. Statistik: Einfluss der Zellart ($p=2.15 \cdot 10^{-33}$), kombinierter Einfluss von Zellart und R848-Konzentration ($p=1.40 \cdot 10^{-135}$), kombinierter Einfluss von Zellart und Zeit ($p=3.11 \cdot 10^{-51}$), kombinierter Einfluss von Zellart, R848-Konzentration und Zeit ($p=1.84 \cdot 10^{-66}$).

Es zeigt sich für beide rezeptortragenden Zelllinien (TLR8 und TLR5/8) eine ausgeprägte Dosisabhängigkeit der gemessenen Luciferaseaktivitäten vom TLR8-Agonisten R848. Die relative Luciferaseaktivität der Kontrollmessungen mit Zellen ohne TLR-Produktion

verbleibt hingegen ungefähr auf dem Ausgangsniveau. Leichte Schwankungen der Luciferaseaktivität sind wahrscheinlich auf die Teilung der Zellen im Messgefäß und damit Veränderung der numerischen Anzahl an Luciferaseenzymen zurückzuführen.

In Bezug auf die beiden rezeptortragenden Zelllinien zeigt sich ein Unterschied betreffend der Aktivierungsstärke: TLR5/8 führt im Vergleich zu TLR8 bei gleicher R848-Stimulation zu einer deutlich stärkeren Aktivierung des NF- κ B-Systems. Wie bereits zuvor beschrieben, sind die Unterschiede in Bezug auf Einfluss der Zellart stark signifikant. Des Weiteren ist für eine nachweisbare Aktivierung der TLR5/8-Zelllinie über den Basiswert hinaus eine geringere Mindestkonzentration des Stimulanz R848 notwendig als bei der TLR8-Zelllinie: Die niedrigste R848-Konzentration, bei der in diesen Experimenten eine Aktivierung der TLR5/8-Zelllinie gemessen werden konnte, beträgt 1.25 μ g/ml; bei der TLR8-Zelllinie sind es hingegen 5 μ g/ml. Schließlich besteht auch ein Unterschied bezüglich des Zeitverlaufs der Aktivierung. Der Höhepunkt der Aktivierung der TLR5/8-Zelllinie zeigt sich unabhängig von der R848-Konzentration nach 50 – 60 h. Bei der TLR8-Zelllinie wird dieser bereits nach 20 – 30 h erreicht.

Im Vergleich zu den Experimenten mit transient TLR8- bzw. TLR5/8-transfizierten Luciferase-Reporterzellen zeigten sich grundsätzlich ähnliche, zeitliche Verläufe der relativen Luciferaseaktivitäten. Allerdings waren zum Erreichen eines annähernd gleichen Biolumineszenzsignals der stabil transfizierten Zelllinien deutlich geringere Konzentrationen an R848 im Vergleich zu den transient transfizierten Zelllinien notwendig. Des Weiteren kommt es bei den stabilen Zelllinien zu einer deutlich stärkeren Antwort von TLR5/8 als von TLR8 auf jeweils dieselbe R848-Konzentration. Unverändert zeigt sich der zeitliche Ablauf des Erreichens der jeweiligen Aktivierungsmaxima, wobei TLR8 sein Maximum früher erreicht als TLR5/8. Nicht mehr beobachten lässt sich für die stabile TLR5/8-Zelllinie ein Verbleib der Aktivierung auf erhöhtem Niveau nach Erreichen des Aktivierungsmaximums. Allerdings konnte im Beobachtungszeitraum kein stabiles Aktivitätsniveau nach Erreichen des Aktivitätsmaximums beobachtet werden. Eine Aussage bezüglich eines persistierend erhöhten Aktivitätsniveaus ist daher für die stabile TLR5/8-Zelllinie nicht möglich.

4.4 Quantitative Bestimmung der Rezeptormenge der stabilen TLR8- und TLR5/8-Zelllinien mittels *Real-time quantitative PCR*

TLR8 und TLR5/8 waren für die Experimente stabil in Luciferase-Reporterzellen transfiziert worden. Es wurde angenommen, dass ein durch die Zelle exprimiertes TLR8-Konstrukt eine definierte Kapazität zur Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs hat und somit eine bestimmte, zu messende Lichtemission verursacht. Die zu vergleichenden, stabilen Zelllinien wurden unter Nutzung von Lentiviren hergestellt. Die gewünschten Genkopien werden hierbei zufällig in das Genom der Zielzelle eingebaut, daher kann die exakte Anzahl an übertragenen Genkopien nicht vorhergesagt werden (Vigna und Naldini 2000). Somit würde bei unterschiedlichen Expressionsraten bezüglich des TLR8-Konstrukts der zu vergleichenden Zelllinien eine unterschiedliche Expression der Luciferase resultieren. Das Ziel eines Vergleichs der Aktivierungskapazität der einzelnen TLR8-Konstrukte bezüglich des NF- κ B-Signalwegs würde somit erschwert.

Per quantitativer *real-time PCR* wurden daher die eingebrachten DNA-Mengen überprüft. Gemäß $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ergab sich ein Verhältnis der Genkopien von TLR8 zu TLR5/8 von 68.6:1. Somit bestand eine erhöhte Expressionsrate von TLR8 in der entsprechenden Zelllinie. Da gemäß $\Delta\Delta Ct$ -Methode die Effizienz der beiden beurteilten PCRs normiert wurde und kein relevanter Größenunterschied beider Konstrukte bestand (TLR8: 3177 bp, TLR5/8: 3216 bp), kann somit von einer höheren Anzahl an Genkopien im Genom der stabilen TLR8-Zelllinie als in der TLR5/8-Zelllinie ausgegangen werden.

Wie unter Punkt 4.3 beschrieben, zeigte sich infolge R848-Aktivierung eine erhöhte Luciferaseaktivität von TLR5/8 als von TLR8. Angesichts geringerer Expressionsraten von TLR5/8 im Vergleich zu TLR8 weist ersterer somit eine vermehrte Kapazität zur Aktivierung der nachgeschalteten NF- κ B-Signalkaskade auf. Ein verstärktes Leuchtsignal aufgrund einer verstärkten Expression von TLR5/8 konnte so ausgeschlossen werden.

4.5 Vorhergesagte Tertiärstruktur von TLR8-YFP

Um eine indirekte, mikroskopische Beobachtung zu ermöglichen, lagen alle verwendeten TLRs in Form eines Fusionsproteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff vor. Unter Verwendung des interaktiven Web-Portals *Phyre2* erstellten wir eine vorhergesagte dreidimensionale Struktur des TLR8-YFP- sowie des TLR5/8-CFP-Fusionsproteins. Diese werden in Abb. 4.6 dargestellt.

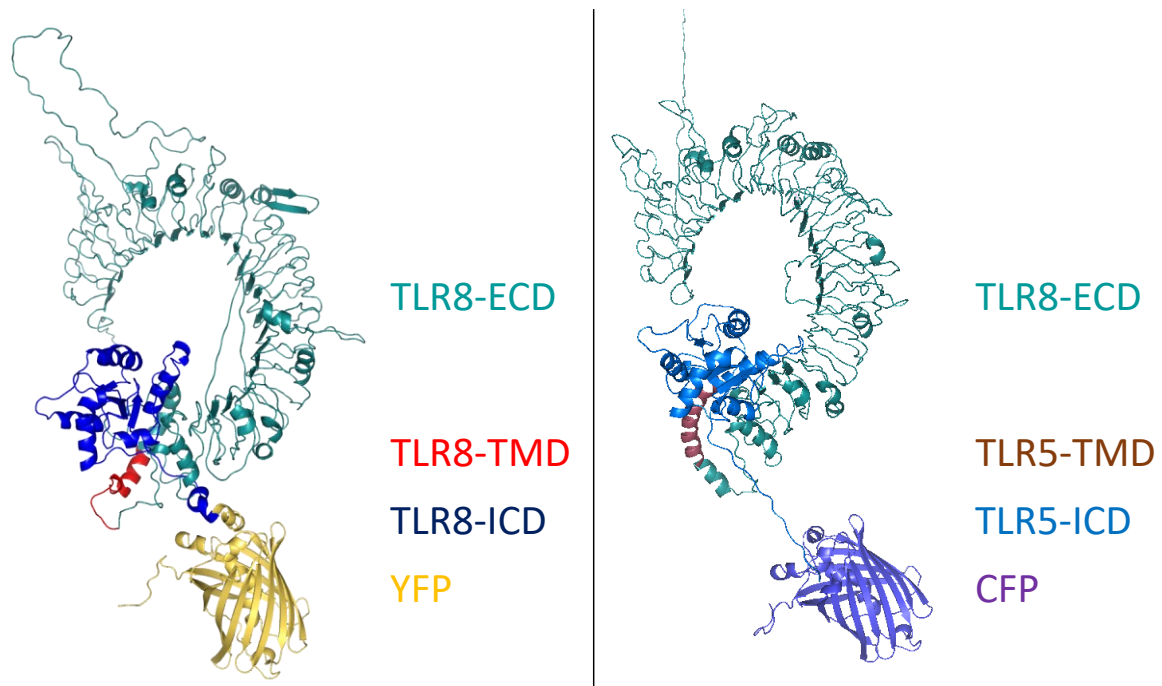


Abb. 4.6: Vorhergesagte 3D-Struktur des TLR8-YFP-Fusionsproteins

Die verschiedenen Anteile der Proteine sind entsprechend farbig gekennzeichnet. ECD: extrazelluläre Domäne. TMD: Transmembrandomäne. ICD: TIR-Domäne. YFP: Yellow fluorescent protein. CFP: Cyan fluorescent protein. Die Vorhersage beruht auf Berechnungen des interaktiven Web-Portals *Phyre2* (Kelley et al. 2015).

Gemäß der Vorhersagen kommt es jeweils zu einer erwartungsgemäßen Faltung der einzelnen Proteindomänen. Strukturell scheinen die Fluoreszenzproteine über einen Linker ausreichend von der ICD getrennt zu werden, um deren Funktion nicht zu beeinträchtigen. Insbesondere umfassen sie diese nicht, sodass die Interaktion der ICD mit dem Adapterprotein MyD88, welches den Anfang der nachgeschalteten Signalkaskade bildet, nicht relevante beeinträchtigt zu sein scheint.

4.6 Mikroskopischer Nachweis der TLR8-Konstrukte

Alle TLR8-Konstrukte waren Fusionsproteine mit je einem an die TIR-Domäne gekoppelten Fluoreszenzprotein. Bei den reinen TLR8-Konstrukten war dies YFP, beim chimären TLR5/8 CFP. Diese Fluoreszenzproteine sind infolge Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge in der Lage, Licht einer höheren Wellenlänge zu emittieren.

Die verschiedenen TLR8-Konstrukte wurden für die Beobachtung mittels Epifluoreszenzmikroskopie transient in HEK293-Zellen transfiziert. Somit konnten neben normalen Durchlichtaufnahmen auch spezifische Aufnahmen der Fluoreszenzproteine und indirekt der daran gekoppelten TLR-Konstrukte angefertigt werden.

Beispielhaft werden in Abb. 4.7 Durchlicht- und Epifluoreszenzaufnahmen vom TLR8-Wildtyp und von TLR8- Δ TIR gezeigt.

In allen Fällen zeigte sich eine Verteilung des Fluoreszenzproteins im Zytoplasma der Zelle, sodass von einer erfolgreichen Transfektion ausgegangen werden kann. Eine verstärkte Fluoreszenzintensität im Bereich der Zellmembran war bei keinem Konstrukt sicher zu eruieren. Dies schließt auch das Konstrukt TLR8- Δ TIR, welches gemäß Literatur in der äußeren Zellmembran lokalisiert sein sollte, mit ein (Itoh et al. 2011).

Da die Epifluoreszenzmethode jedoch nicht optimal zur optischen, quantitativen Lokalisationsbestimmung geeignet ist, können hier nur beschränkt Aussagen zur Verteilung der TLR8-Konstrukte innerhalb der Zellen gemacht werden. Die stärkere, funktionelle Reaktion auf den TLR8-Liganden R848 könnte jedoch für das Konstrukt TLR8-mutY871 auf eine Integration in die äußere Zellmembran hindeuten.

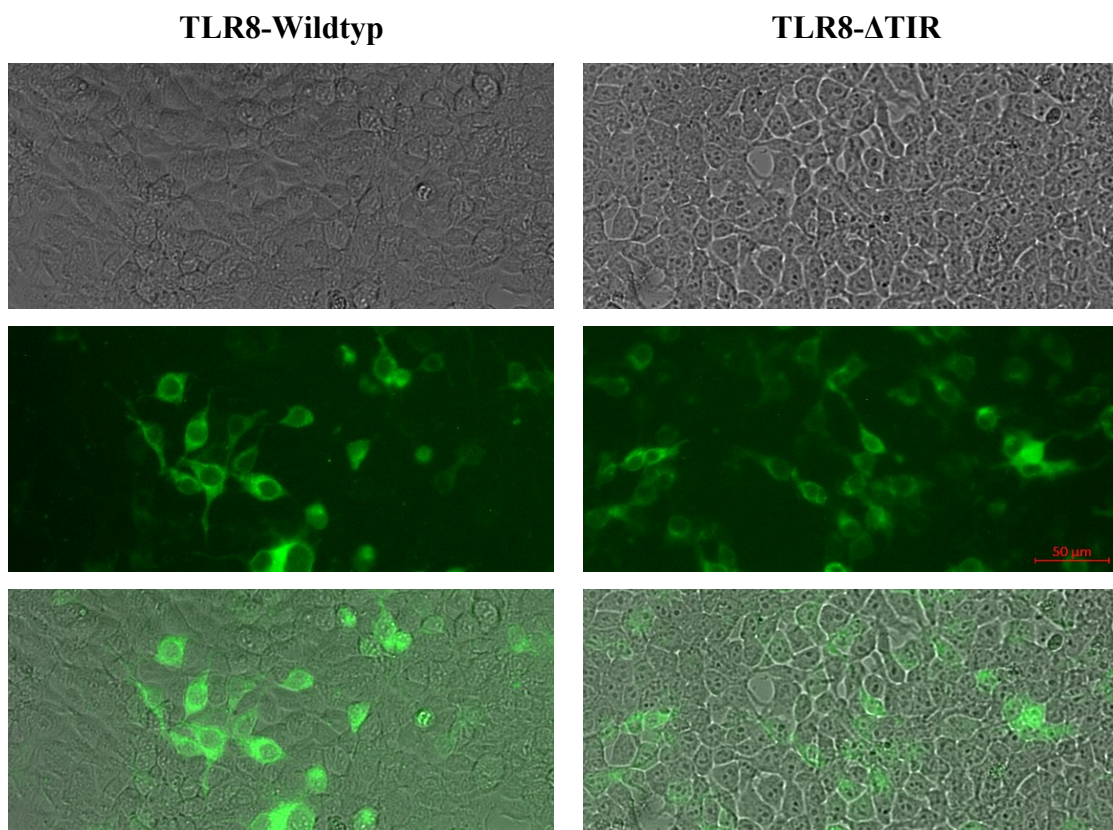


Abb. 4.7: Mikroskopiebilder von HEK293-Zellen mit transienter Expression von TLR8-Wildtyp und TLR8- Δ TIR

Beispielhafte Darstellung vom TLR8-Wildtyp (links) und TLR8- Δ TIR (rechts). Oben: Durchlichtaufnahmen. Mitte: Epifluoreszenzaufnahmen. Unten: kombinierte Aufnahme.

4.7 Screening zur Aktivierbarkeit vom TLR8-Wildtyp und TLR5/8 durch zugelassene Medikamente

Wir führten ein Screening mit der Frage nach der Aktivierbarkeit der stabilen TLR5/8-Zelllinie mit einem Großteil der von der FDA zugelassenen Medikamente durch. Hierfür wurde die TLR5/8-Zelllinie ausgewählt, da diese in den Stimulationsexperimenten eine leichtere Aktivierbarkeit durch R848 gezeigt hatte als die TLR8-Zelllinie. Als Negativkontrolle wurde eine Luciferase-Reporterzelllinie gewählt, die nicht über TLR8 oder TLR5/8 verfügt. Stattdessen exprimiert diese ausschließlich TLR4, welcher natürlicherweise in der äußeren Zellmembran lokalisiert ist und LPS bindet (Shah et al. 2014). Schließlich wurden die Wirkungen der TLR5/8-aktivierenden Medikamente mit TLR8 hinsichtlich eines möglicherweise bestehenden Unterschieds in der maximalen Aktivierungsstärke verglichen.

Die Zellen wurden in Well-Platten eingesät, welche in jedem Well einen der von der FDA zugelassenen, medikamentösen Wirkstoffe enthalten. Im Falle einer Aktivierung des NF- κ B-Systems wurde das im Kulturmedium enthaltene Luciferin unter Aussendung von Licht umgesetzt und diese Biolumineszenz über die Zeit gemessen. Die jeweiligen Aktivitätsmaxima beider Zelllinien wurden in Bezug auf jeden Wirkstoff dokumentiert.

Um eine Auswertung und Vergleichbarkeit der gewonnenen Aktivitätsmaxima zu gewährleisten, wurden diese mittels Errechnung des Z-Scores standardisiert. Dieser korreliert mit der gemessenen Lichtstärke und somit auch mit der Aktivierung des NF- κ B-Systems durch das jeweilige Medikament. Isoliert lässt er jedoch keinen Rückschluss auf den Mechanismus der Aktivierung einer Zelllinie zu, sondern muss im Vergleich zum Z-Wert der anderen Zelllinie betrachtet werden. Zu erwähnen ist, dass deshalb auch negative Z-Scores im Sinne einer im Vergleich zum Mittelwert geringeren, gemessenen Biolumineszenzintensität möglich sind. Eine beispielhafte Übersicht über die Ergebnisse zeigt Abb. 4.8.

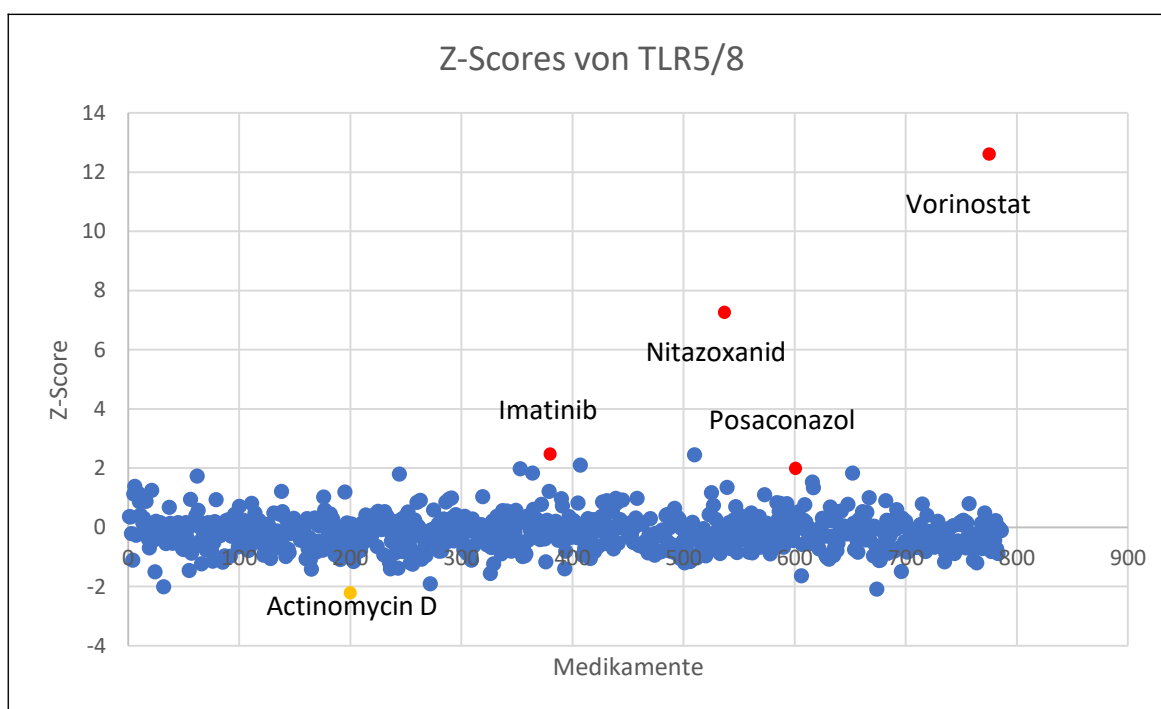


Abb. 4.8: Übersicht über das Aktivierungsverhalten der stabilen TLR5/8-Zelllinie infolge Zugabe verschiedener Medikamente

Das Diagramm zeigt die berechneten Z-Scores für alle getesteten Medikamente in Bezug auf eine Aktivierung der stabilen TLR5/8-Reporterzelllinie. Exemplarisch sind vier Medikamente mit hohen Z-Scores (rot) sowie Actinomycin D (orange) mit dem niedrigsten Z-Score hervorgehoben. Entsprechend des hohen Z-Scores war von einer aktivierenden Wirkung des jeweiligen Medikaments auf die TLR5/8-Zellen auszugehen. Die rot gefärbten Medikamente wurden für weitere Experimente ausgewählt.

Im weiteren Verlauf werden die Medikamente mit den höchsten Z-Scores bei Messung mit der TLR5/8-Zelllinie betrachtet. Diese Medikamente sind in Abb. 4.8 rot hervorgehoben. Die Z-Scores dieser Medikamente betragen, jeweils genannt für die TLR5/8- und danach die TLR4-Kontrollzelllinie: Vorinostat: 12.6/3.3, Nitazoxanid: 7.2/11.1, Imatinib: 2.5/3.4 und Posaconazol: 2.0/-0.2. Es scheint keine Korrelation zwischen den Z-Scores für die TLR5/8- und die TLR4-Kontrollzelllinie zu bestehen.

Im Folgenden wurden die Differenzen der Z-Scores der TLR5/8- und der TLR4-Kontrollzelllinie gebildet. Es ergab sich für Vorinostat: 9.3, Nitazoxanid: -3.9, Imatinib: -0.9 und Posaconazol 1.8. Je positiver die Differenz ausfällt, desto größer ist die Aktivierung der TLR5/8-Zelllinie im Vergleich zur Kontrolle als Reaktion auf das entsprechende Medikament. Dieser Effekt scheint für Vorinostat am stärksten ausgeprägt zu sein. Entsprechend ist von einer agonistischen Wirkung von Vorinostat auf TLR5/8 auszugehen.

In weiteren Experimenten wurde die Wirkung der Medikamente Vorinostat, Nitazoxanid, Imatinib und Posaconazol auf TLR8 und TLR5/8 verglichen. Auch hier wurden die generierten, stabilen Reporterzelllinien genutzt. Als Negativkontrolle wurden Luciferase-Reporterzellen verwendet, welche auch die Grundlage für die stabile Transfektion gebildet hatten. Die Ergebnisse zeigt Abb. 4.9.

Nach Zugabe von Vorinostat, einem Histon-Deacetylase-Inhibitor, kam es zu einem Anstieg der relativen Luciferaseaktivitäten beider, stabiler Zelllinien. Dieser ist bei TLR8 stärker ausgeprägt (Anstieg auf max. 2.3x Ausgangs-Luciferaseaktivität) als bei TLR5/8 (max. 1.4x Ausgangsaktivität). Ein Aktivitätsmaximum wurde während der Messdauer nicht beobachtet. Ebenso wurde kein Anstieg der relativen Luciferaseaktivität der Kontrollzelllinie beobachtet.

Bei den anderen, untersuchten Medikamenten zeigte sich nach einer während der ersten fünf Stunden etwa gleichbleibenden Luciferaseaktivität der beiden TLR-tragenden Zelllinien ein langsames Absinken dieser bis auf die etwa 0.5x Ausgangsaktivität. Dabei war die relative Luciferaseaktivität von TLR8 stets grösser als die von TLR5/8 und beide zu jedem Zeitpunkt grösser als die Kontrolle mit untransfizierten Luciferase-Reporterzellen. Einzige Ausnahme bildet Imatinib, wo die relative Luciferaseaktivität der TLR5/8-Zelllinie für einige Stunden die der Kontrollzelllinie unterschreitet.

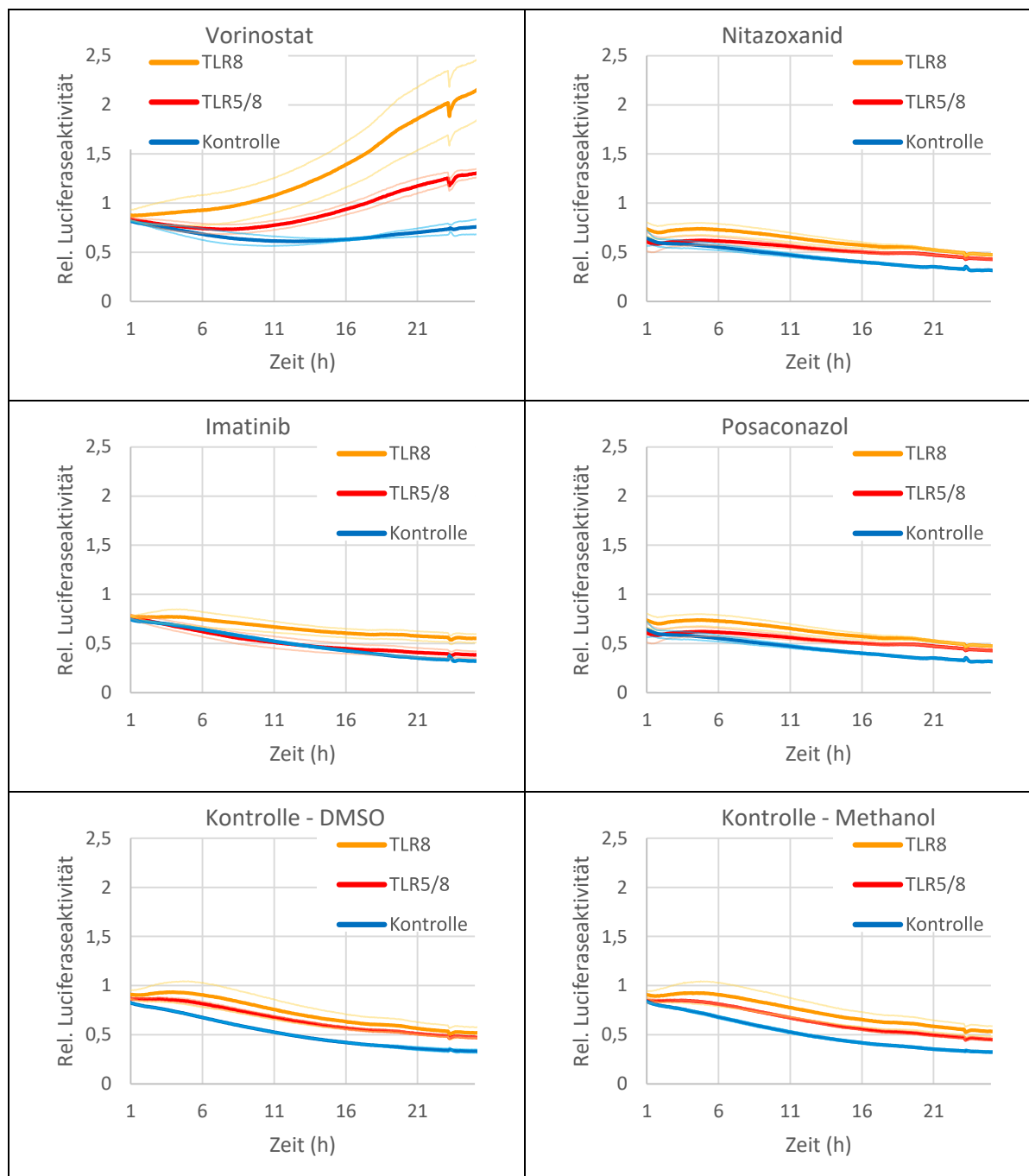


Abb. 4.9: Medikamenteninduzierte Stimulation der stabilen TLR5/8- und TLR8-Zelllinien

Dargestellt sind die zeitabhängigen, relativen Luciferaseaktivitäten der stabilen TLR8- (gelbe Kurven) und TLR5/8-Zelllinien (rote Kurven) nach Stimulation mit Vorinostat, Nitazoxanid, Imatinib bzw. Posaconazol in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$. Als Negativkontrolle dienten jeweils untransfizierte Luciferase-Reporterzellen (blaue Kurven). Einzig Vorinostat bewirkte einen Anstieg der relativen Luciferaseaktivität beider TLR-tragenden Zelllinien. Die Medikamente waren in DMSO bzw. Methanol gelöst. Diese führten isoliert nicht zu einem nennenswerten Anstieg der relativen Luciferaseaktivität. Statistik: Einfluss der Zellart ($p=2.08 \cdot 10^{-45}$), Einfluss des Medikaments ($p=7.15 \cdot 10^{-46}$), kombinierter Einfluss von Substanz und Zelltyp ($p=1.69 \cdot 10^{-03}$).

Trotz rechnerisch signifikanter Unterschiede besteht angesichts des sehr ähnlichen Verlaufs der Aktivitätskurven wahrscheinlich kein biologisch relevanter Unterschied zwischen den Verläufen der relativen Luciferaseaktivitäten der Medikamente Nitazoxanid, Imatinib und Posaconazol im Vergleich zu den Lösungsmitteln DMSO bzw. Methanol. Insofern wirken diese Medikamente wahrscheinlich nicht agonistisch am TLR8.

Zu erwähnen ist, dass die relative Luciferaseaktivität nach Ende des Vorlaufs stets für einen kurzen Zeitraum geringer war als der Mittelwert der Vorlaufmessungen. Dies war wahrscheinlich durch das technisch bedingte Abkühlen der Zellen während des Hinzufügens des jeweiligen Medikaments bedingt.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Vorinostat eine agonistische Wirkung am TLR8 entwickelt. Dies war gemäß unserem Kenntnisstand bis dato unbekannt.

5 Diskussion

5.1 Vergleichende Untersuchung des Aktivierungsverhaltens TLR8-exprimierender Zellen infolge R848-Stimulation

TLR8 ist als intrazellulärer TLR in der Lage, RNA-Fragmente von Viren und Bakterien sowie synthetische Imidazoquinolinderivate zu binden (Cervantes et al. 2012, Murphy 2018). Infolge der Ligandenbindung kommt über die nachgeschaltete Signalkaskade zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit konsekutiv vermehrter Produktion proinflammatorischer Zytokine (Kawai und Akira 2006). Gemäß unserem Kenntnisstand ist es bis dato ungeklärt, welcher Teil der Aminosäuresequenz des TLR8 für dessen intrazelluläre Lokalisation verantwortlich ist (Leifer et al. 2006, Nishiya et al. 2005). Es existieren jedoch Hinweise, dass sich eine entsprechende Lokalisierungssequenz in der intrazellulären Domäne des TLR8 befinden könnte (Itoh et al. 2011).

Wir identifizierten potentielle Lokalisierungssequenzen innerhalb der ICD von TLR8. Darauf gestützt wurden TLR8-Mutanten mit jeweils einer Mutation oder Deletion dieser Sequenzen generiert. Anschließend wurde das Aktivierungsverhalten aller TLR8-Mutation infolge Stimulation durch R848 mittels eines Luciferase-Reporter-Assays überprüft (Herold 2012, Jurk et al. 2002). Hierbei konnte für die TLR8-Konstrukte TLR8-mutY871A und TLR5/8, bestehend aus der ECD von TLR8 sowie der TMD und ICD von TLR5, eine erhöhte, maximale Luciferaseaktivität im Vergleich zum TLR8-Wildtyp festgestellt werden. Für TLR5/8 wurde des Weiteren ein niedrigerer Schwellenwert für die Aktivierung durch R848 nachgewiesen.

In Experimenten anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierungsstärke der MAP-Kinase-Kaskade abhängig vom Ursprungsort der Stimulation ist: Sie ist bei Aktivierung ausgehend von der Plasmamembran erhöht im Vergleich zur Aktivierung ausgehend vom Zytosol. Dabei ist auch der Schwellenwert für die Aktivierung ausgehend von der Plasmamembran niedriger als bei einem Ausgang vom Zytosol (Harding et al. 2005). Daraus abgeleitet stellten wir die Hypothese auf, dass ein in die Zellmembran relokalisierter TLR8 eine höhere Fähigkeit zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade besitzen könnte als der entsprechende TLR8-Wildtyp.

Dieser wird intrazellulär exprimiert (Blasius und Beutler 2010). Insofern besteht die Möglichkeit, dass sich die oben genannten TLR8-Konstrukte TLR8-mutY871A und TLR5/8 in der äußeren Zellmembran befinden. Bezüglich TLR5/8 würde dies zu den Ergebnissen von Nishiya und DeFranco (2004) passen. Sie hatten festgestellt, dass Herkunft der TMD und ICD von TLRs für deren Lokalisation entscheidend sind. Beide stammen bei TLR5/8 von TLR5, welcher natürlicherweise in der äußeren Zellmembran lokalisiert ist (Shah et al. 2014).

Im Anschluss erfolgte über gekoppelte Fluoreszenzproteine (YFP oder CFP) eine epifluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Lokalisation von TLR8-mutY871A und TLR5/8 im Vergleich zum TLR8-Wildtyp sowie TLR8- Δ TIR, einem Konstrukt mit deletierter TIR-Domäne. TLR8-Wildtyp befindet sich gemäß Literatur zum größten Teil in intrazellulären Membranen (Miggin und O'Neill 2006); eine antikörpervermittelte Anfärbung von TLR8- Δ TIR zeigte gemäß Literatur eine Lokalisation in der äußeren Zellmembran (Itoh et al. 2011). Unser Ansatz, die Fusion eines Zielproteins mit einem Fluoreszenzprotein, ist eine etablierte Methode, um die intrazelluläre Expression von Proteinen zu evaluieren sowie ggf. ihren Transport innerhalb der Zelle zu beobachten (Morin et al. 2001). In den meisten Fällen bleiben dabei die intrazelluläre Lokalisation und die Funktion des zu beobachtenden Proteins erhalten (Lundin et al. 2000, Zimmer 2002). Epifluoreszenzmikroskopisch konnte kein Unterschied in der Verteilung der gekoppelten Fluoreszenzproteine zwischen dem TLR8-Wildtyp und den TLR8-Mutanten nachgewiesen werden. Insbesondere konnten für TLR8- Δ TIR die Ergebnisse von Itoh et al. (2011) nicht reproduziert werden. Gemäß deren Arbeit sei TLR8- Δ TIR in der äußeren Zellmembran lokalisiert, während der TLR8-Wildtyp intrazellulär exprimiert wird (Blasius und Beutler 2010). Es bleibt derzeit unklar, ob anhand unserer Ergebnisse eine Aussage über die Verteilung der TLR-Konstrukte innerhalb der Zelle getroffen werden kann. Verschiedene Störfaktoren könnten die Verteilung der TLR8-Konstrukte innerhalb der Zellen beeinflussen. Zum einen könnte der Transport der Proteine vom ER in die Zielmembran gestört sein: Die codierende DNA für TLR8-mutY871A und TLR8- Δ TIR wurde per transienter Transfektion in die Zellen eingebracht. Es ist bekannt, dass es bei dieser Transfektionsform zu einer Überproduktion der transfizierten Proteine kommen kann (Gibson et al. 2013). Die zellulären Transportmechanismen für Proteine sind sättigungsfähig (Marks 1996), sodass eine Überlastung dieser Transportmechanismen mit konsekutiv veränderter, intrazellulärer Verteilung der Proteine möglich scheint.

Die Fluoreszenzproteine (YFP oder CFP) sind physisch an die intrazelluläre Domäne des jeweiligen TLR gebunden. Wie bereits erwähnt, bleiben Lokalisation und Funktion des Proteins trotz Bindung des Fluoreszenzproteins häufig erhalten (Lundin et al. 2000, Zimmer 2002). Auch haben eukaryotische Zellen wie die verwendeten HEK-293-Zellen eine hohe Kapazität, Fusionsproteine wie die verwendeten TLR8-YFP/CFP-Konstrukte korrekt zu falten (Chang et al. 2005). Trotzdem kann ein Einfluss des Fluoreszenzproteins auf den Transport des TLR-Konstrukts innerhalb der Zelle nicht ausgeschlossen werden. Zudem ist bekannt, dass sich isoliertes GFP im gesamten Zytoplasma verteilt (Ogawa et al. 1995). In diesem Sinne könnte die generalisierte Verteilung der Fluoreszenzproteine innerhalb des Zytosols der Zellen darauf hindeuten, dass das Fluoreszenzprotein mindestens z.T. unabhängig vom TLR gebildet wird. Hinweise dafür, dass es die Faltung der ICD verändert, liegen gemäß vorhergesagter 3D-Struktur des Fusionsproteins TLR8-YFP nicht vor.

In diesem Sinne müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um die intrazelluläre Lokalisation der TLR-Konstrukte zu überprüfen. Eine Verbesserung könnte hier die Arbeit mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bringen, womit eine erhöhte Auflösung der Bilder und somit genauere Betrachtung der Zellen möglich wäre (Cox und Sheppard 2004). Ein anderer Ansatz wäre die Markierung der TLR8-Konstrukte mittels Einbringens eines oder mehrerer Strep-Tags in die ECD der TLR8-Konstrukte (Skerra und Schmidt 1999). Dies scheint gemäß Literatur keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins oder deren Lage in der Plasmamembran zu haben (Groß et al. 2002, Nishiya und DeFranco 2004). Im Anschluss wäre eine Detektion der markierten Proteine mittels Strep-Tactin-Konjugat oder eines konjugierten Antikörpers möglich (Terpe 2003). In diesem Fall könnte auf die Fusion der TLR8-Konstrukte mit einem Fluoreszenzprotein verzichtet und somit ein Einfluss des Fluoreszenzproteins auf die zelluläre Verteilung der TLR8-Konstrukte ausgeschlossen werden.

Während die Stimulation von Zellen mit TLR8-mutY871A und TLR5/8 mittels R848 zu einer verstärkten NF- κ B-Aktivierung führte, zeigte sich diese für Zellen mit allen anderen TLR8-Konstrukten vermindert im Vergleich zu Zellen mit dem TLR8-Wildtyp. Alle Mutationen wurden innerhalb der ICD von TLR8 vorgenommen. Diese ist für die Interaktion mit dem Adaptermolekül MyD88 verantwortlich, welches am Beginn der jeweils nachgeschalteten Signalkaskade steht (Ohto et al. 2014). Somit ist es möglich, dass die eingefügten Mutationen die Interaktionsfähigkeit der ICD mit MyD88 veränderten.

Insbesondere die Stimulation von Zellen mit TLR8- Δ TIR verursachte keinen relevanten Anstieg der NF- κ B-Aktivierung. Angesichts der deletierten TIR-Domäne ist es möglich, dass die verringerte NF- κ B-Aktivierung auf eine gestörte Interaktion des TLR8-Konstrukts mit MyD88 zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz zeigten sich für den Verlauf der NF- κ B-Aktivierung aller Zelllinien für $p < 0.05$ rechnerisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle. Unter der Hypothese, dass TLR8- Δ TIR jedoch eine deutlich eingeschränkte Fähigkeit zur Interaktion mit der nachgeschalteten Signalkaskade hat, dürfte der Aktivierungsverlauf sich nicht wesentlich vom Verlauf der untransfizierten Kontrolle unterscheiden. Es ist daher fraglich, ob diese rechnerische Signifikanz auch biologisch relevant ist. Ggf. wäre hier basierend auf den Negativkontrollen eine andere, biologisch sinnvolle Signifikanzgrenze zu wählen.

Neben den erwähnten Ergebnissen zeigte sich insbesondere bei den transienten Transfektionen ein persistierend erhöhtes Aktivitätsniveau von TLR5/8 nach Erreichen des Aktivitätsmaximums im Vergleich zum TLR8-Wildtyp. Möglich wäre ein veränderter Aktivierungsmechanismus des MyD88 durch die ICD, welche von TLR5 abstammt, und hierdurch bedingt persistierende Aktivierung der nachgeschalteten Signalkette. Klarheit hierüber könnte ein Vergleich der NF- κ B-Aktivierung durch die Wildtypen von TLR5 und TLR8 bringen.

Zusammenfassend führte die Stimulation von TLR8-mutY871A- und TLR5/8-Zellen mit R848 zu einer erhöhten NF- κ B-Aktivierung im Vergleich zu Zellen mit dem TLR8-Wildtyp. Dies bestätigt, dass Mutationen im TLR eine Veränderung der nachgeschalteten Signalkaskade und entsprechend der NF- κ B-Aktivierung auslösen können. Eine deregulierte, insbesondere erhöhte, NF- κ B-Aktivierung ist jedoch mit dem Auftreten von Autoimmunkrankheiten wie beispielsweise rheumatoider Arthritis assoziiert (Liu et al. 2017). Eine wichtige Rolle spielen hierbei sowohl die Dysregulation von Proteinen, die an den TLR-Signalkaskaden beteiligt sind als auch Einzelnukleotid-Polymorphismen innerhalb der TLRs selbst. Beide können das Aktivierungsverhalten von TLRs verändern (Chen et al. 2016, Pelka et al. 2016). Spezifische Mutationen, welche das Aktivierungsverhalten von TLR8 verändern, sind bisher gemäß unserem Kenntnisstand v.a. in der ECD von TLR8 bekannt (Tanji et al. 2013). Wir konnten zeigen, dass die kombinierte Mutation 2611T>G und 2612A>C innerhalb der ICD des TLR8 zu einer verstärkten NF- κ B-Aktivierung führt. Dies ist unabhängig von der Lokalisation des Rezeptors zu werten. Vor diesem Hintergrund erscheint es wichtig, die Rolle von TLRs in

Bezug auf die Pathogenese von Autoimmunkrankheiten weiter zu überprüfen, um ggf. auch Therapieansätze in Form von TLR-Modulatoren zu identifizieren.

5.2 Screening zur medikamentösen Aktivierbarkeit TLR8-exprimierender Zellen

Es wurde ein Screening zur Aktivierbarkeit TLR8-exprimierender Zellen durch die von der FDA zugelassenen Medikamente durchgeführt. Hierbei ließ sich ein positives Ergebnis für Vorinostat, einen Histon-Deacetylase-Inhibitor, nachweisen. Dieser ist beispielsweise in den USA zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen (Mann et al. 2007).

Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACIs) sind Medikamente, welche die Deacetylierung von Lysinen innerhalb der Proteinstruktur von Histonen hemmen. Hierbei greifen sie in ein komplexes Wechselspiel zwischen Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDAC) ein. Erstere übertragen, letztere entfernen Acetylgruppen von Lysinen innerhalb der Proteinstruktur der Histone. Infolge Acetylierung werden positive Ladungen im Bereich der Aminogruppe der beteiligten Lysine neutralisiert, wodurch wiederum eine Reduktion der Affinität dieser Aminogruppen zu den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA bewirkt wird. Hiermit wird im Allgemeinen eine Auflockerung der DNA-Struktur und damit erleichterte Ablesbarkeit bzw. Bindung von Transkriptionsfaktoren gewährleistet. HDACs führen hingegen zu einer Verdichtung der Chromatinstruktur (Manal et al. 2016, Verdone et al. 2006). Entsprechend bewirken HDACIs über eine Hemmung von HDACs eine Auflockerung der Chromatinstruktur. Daneben haben HDACIs weitere, bisher im Mechanismus nicht vollkommen verstandene Wirkungen: Neben der Acetylierung von Histonen fördern sie auch die Acetylierung anderer Proteine wie Transkriptionsfaktoren und DNA-Reparaturenzymen. Sie wirken antiproliferativ sowie immunsuppressiv, z.T. wird die Transkription proinflammatorischer Gene gehemmt, weshalb davon ausgegangen wird, dass die gehemmten HDAC selbst als Onkogene wirken (Bode und Dalpke 2011, Ceccacci und Minucci 2016).

Entgegen dieser gesamtheitlichen Wirkung bewirkt Vorinostat mindestens in niedrigen Konzentrationen eine verstärkte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Ashburner et al. 2001, Hsu et al. 2014), wobei der genaue Grund hierfür unbekannt ist. Diese Beobachtung konnten wir nach Vorinostat-Stimulation von TLR8-transfizierten, NF- κ B-sensitiven Luciferase-Reporterzellen bestätigen. Es kam zu einem Anstieg der Luciferaseaktivität, was auf eine vermehrte Aktivierung von NF- κ B schließen lässt. Eine

entsprechende Kontrolle mit identischen Reporterzellen ohne Transfektion von TLR8 zeigte keinen Anstieg der Luciferaseaktivität. Wir schlossen hieraus, dass es möglicherweise zu einer Bindung von Vorinostat an TLR8 kommt und dadurch die nachgeschaltete Signalkaskade aktiviert wird. Diese Wechselwirkung ist gemäß unserem Kenntnisstand bis dato unbekannt. Aufgrund der nachweisbaren Wirkung von Vorinostat auf den hauptsächlich intrazellulär gelegenen TLR8-Wildtyp scheint das Medikament diesem zugänglich gemacht zu werden (Miggin und O'Neill 2006). Weitere Experimente wären notwendig, um eine mögliche Aufnahme von Vorinostat in die Zellen abzuklären.

Synthetische TLR7- und TLR8-Agonisten werden bezüglich ihrer antiproliferativen Wirkung bereits seit Längerem erforscht, um einen möglicherweise therapeutischen Ansatz in der Krebstherapie zu evaluieren (Schon und Schon 2008). Diesbezüglich ist der TLR7-Agonist Imiquimod beispielsweise bereits in der Therapie des superfiziellen Basalzellkarzinoms etabliert (Geisse et al. 2004). Auch für das betrachtete Medikament Vorinostat ist eine antiproliferative Wirkung bekannt, deren Mechanismus komplex und bisher nur zum Teil verstanden zu sein scheint (Grant et al. 2007). In unseren Experimenten scheint Vorinostat eine agonistische Wirkung auf TLR8 zu entfalten. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass dieser agonistische Effekt einen Wirkmechanismus hinsichtlich der antiproliferativen Wirkung von Vorinostat darstellt.

Auch bezüglich der anderen, humanen TLRs werden Anstrengungen unternommen, eine Wirkung der jeweiligen Signalkaskade auf das Tumorstwachstum zu untersuchen, um mögliche Krebstherapien zu evaluieren (Kaczanowska et al. 2013). In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass bekannt antiproliferative Substanzen ihre entsprechende Wirkung über die Modulation von TLR-Signalkaskaden bewirken. Somit könnte es von Bedeutung sein, auch andere Substanzen hinsichtlich einer möglichen Wirkung auf TLRs zu überprüfen. Stabile Zelllinien wie die bei uns etablierte TLR8-Reporterzelllinie könnten hierbei hilfreich sein.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

TLRs sind als Teil des angeborenen Immunsystems mitverantwortlich für die Abwehr von Infektionen (Murphy 2018), sie können jedoch infolge genetischer Polymorphismen mit konsekutiv veränderter Funktion auch an der Entstehung autoimmuner Erkrankungen beteiligt sein (Chen et al. 2016, Hamerman et al. 2016). Vor diesem Hintergrund erscheint es zum einen sinnvoll, die Funktionsweise von TLRs abhängig von Mutationen näher zu charakterisieren, zum anderen bieten TLRs mögliche Ansatzpunkte für die Therapie autoimmuner Erkrankungen (Zouali und La Cava 2019).

Wir stellten in dieser Arbeit TLR8-Konstrukte mit Mutationen potentieller Lokalisierungssequenzen her und führten Stimulationsexperimente mit diesen Rezeptoren auf der Basis eines Luciferase-Reporterassays durch. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Mutationen innerhalb der ICD von TLR8 die ausgelöste Reaktion sowohl verstärken als auch abschwächen können. Entsprechendes war gemäß unserem Kenntnisstand bis dato v.a. für Mutationen innerhalb der ECD von TLR8 bekannt (Tanji et al. 2013).

Die ICD von TLR8 ist neben der Interaktion mit Proteinen der nachgeschalteten Signalkaskade auch für die zelluläre Lokalisation des Rezeptors innerhalb endosomaler Membranen von Bedeutung (Itoh et al. 2011, Ohto et al. 2014). Infolge Mutation einer entsprechenden Lokalisierungssequenz wäre eine Relokalisierung des Rezeptors in die äußere Zellmembran zu erwarten. In der epifluoreszenzmikroskopischen Beurteilung der Konstrukte zeigte sich jedoch eine Verteilung der gekoppelten Fluoreszenzproteine innerhalb des Zytoplasmas. Möglicherweise sind gekoppelte Fluoreszenzproteine zur Lokalisierung der Rezeptoren ungeeignet. Zur abschließenden Klärung hinsichtlich der zellulären Lokalisierung der generierten Konstrukte müssen daher weitere Experimente, beispielsweise unter Verwendung eines Strep-Tags, durchgeführt werden.

Zusammenfassend können Mutationen eines Rezeptors dessen Funktion und zelluläre Lokalisierung verändern. Die Kenntnis des Effekts solcher Mutationen innerhalb von Rezeptoren wie dem TLR8 könnte in Zukunft das Verständnis für die Genese von z.B. autoimmunen oder neoplastischen Krankheiten erweitern. Im weiteren Verlauf könnten in Kenntnis bestimmter TLR-Mutationen zielgerichtete Therapien entwickelt werden, welche

über eine spezifische TLR-Modulation möglicherweise nebenwirkungsärmer sind als derzeitige Therapien.

Bezüglich der medikamentösen TLR-Modulation bestehen bereits erste Ansätze: Beispielsweise wird Imiquimod, ein TLR7-Agonist, in der Therapie des superfiziellen Basalzellkarzinoms eingesetzt (Goebeler und Hamm 2017). Wir gingen davon aus, dass bereits bekannte, immunmodulierende Medikamente ebenfalls in der Lage sein könnten, die Aktivität von TLRs zu beeinflussen. In einem Screening mit den von der FDA zugelassenen Medikamenten konnte entsprechend eine TLR8-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Vorinostat, einen Histon-Deacetylase-Inhibitor, nachgewiesen werden. Die von uns verwendete Vorgehensweise könnte auch im weiteren Verlauf zur Identifikation von TLR-wirksamen Medikamenten mittels eines Screeningtests auf der Basis eines Luciferase-Reporterassays genutzt werden. Bei Nachweis einer TLR-Modulation durch ein Medikament könnte dieses Medikament für weitere Versuche zur Behandlung von entsprechend TLR-basierenden Krankheiten berücksichtigt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4 (7):499-511.
- Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS, Jr. 2001. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol*, 21 (20):7065-7077.
- Barton GM. 2007. Viral recognition by Toll-like receptors. *Semin Immunol*, 19 (1):33-40.
- Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*, 7 (1):49-56.
- Bell JK, Mullen GED, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology*, 24 (10):528-533.
- Blasius AL, Beutler B. 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32 (3):305-315.
- Bode KA, Dalpke AH. 2011. HDAC inhibitors block innate immunity. *Blood*, 117 (4):1102-1103.
- Bonifacino JS, Traub LM. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, 72:395-447.
- Bortz J, Schuster C. 2011. Statistik für Human-und Sozialwissenschaftler. Springer-Verlag.
- Brasier AR, Tate JE, Habener JF. 1989. Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *BioTechniques*, 7 (10):1116-1122.
- Brunner E, Domhof S, Langer F. 2002. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. Probability and Statistics New York: John Wiley & Sons Google Scholar.
- Butel JS, Jarvis DL. 1986. The plasma-membrane-associated form of SV40 large tumor antigen: biochemical and biological properties. *Biochim Biophys Acta*, 865 (2):171-195.
- Ceccacci E, Minucci S. 2016. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia. *Br J Cancer*, 114 (6):605-611.
- Cervantes J, Maulén N, Chai H-H. 2016. Tlr8.1-8.
- Cervantes JL, Weinerman B, Basole C, Salazar JC. 2012. TLR8: the forgotten relative revindicated. *Cell Mol Immunol*, 9 (6):434-438.
- Chang HC, Kaiser CM, Hartl FU, Barral JM. 2005. De novo folding of GFP fusion proteins: high efficiency in eukaryotes but not in bacteria. *J Mol Biol*, 353 (2):397-409.
- Chen JQ, Szodoray P, Zeher M. 2016. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*, 50 (1):1-17.
- Cox G, Sheppard CJ. 2004. Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy. *Microsc Res Tech*, 63 (1):18-22.
- de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 7 (2):725-737.
- DeLano WL. 2002. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsletter On Protein Crystallography*, 40 (1):82-92.
- Dörries R. 2017. Allgemeine Virologie. In: Hof H, Dörries R, Hrsg. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 6., unveränderte Auflage Aufl: Georg Thieme Verlag.

- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, 7 (1):379-387.
- Dyer BW, Ferrer FA, Klinedinst DK, Rodriguez R. 2000. A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. *Anal Biochem*, 282 (1):158-161.
- Forsbach A, Nemorin JG, Montino C, Muller C, Samulowitz U, Vicari AP, Jurk M, Mutwiri GK, Krieg AM, Lipford GB, Vollmer J. 2008. Identification of RNA Sequence Motifs Stimulating Sequence-Specific TLR8-Dependent Immune Responses. *The Journal of Immunology*, 180 (6):3729-3738.
- Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. 2004. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol*, 50 (5):722-733.
- Gibson TJ, Seiler M, Veitia RA. 2013. The transience of transient overexpression. *Nat Methods*, 10 (8):715-721.
- Goebeler M, Hamm H. 2017. *Basiswissen Dermatologie*. Springer.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36 (1):59-74.
- Grant S, Easley C, Kirkpatrick P. 2007. Vorinostat. *Nat Rev Drug Discov*, 6 (1):21-22.
- Groß R, Pisa R, Simon J, Kröger A. 2002. Isolierung der trimeren Hydrogenase aus *Wolinella succinogenes* durch StrepTactin®- Affinitätschromatographie. *BIOSpektrum*, 01/2002:101-102.
- Hamerman JA, Pottle J, Ni M, He Y, Zhang ZY, Buckner JH. 2016. Negative regulation of TLR signaling in myeloid cells--implications for autoimmune diseases. *Immunol Rev*, 269 (1):212-227.
- Harding A, Tian T, Westbury E, Frische E, Hancock JF. 2005. Subcellular localization determines MAP kinase signal output. *Curr Biol*, 15 (9):869-873.
- Herold K. 2012. Die Nutzung von Toll-like-Rezeptoren in zellbasierten Assays zum Nachweis bakterieller Bestandteile.
- Hess NJ, Jiang S, Li X, Guan Y, Tapping RI. 2017. TLR10 Is a B Cell Intrinsic Suppressor of Adaptive Immune Responses. *J Immunol*, 198 (2):699-707.
- Hof H. 2017. *Medizinische Mikrobiologie*. 6., unveränderte Auflage Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG.
- Hsu FT, Liu YC, Chiang IT, Liu RS, Wang HE, Lin WJ, Hwang JJ. 2014. Sorafenib increases efficacy of vorinostat against human hepatocellular carcinoma through transduction inhibition of vorinostat-induced ERK/NF-kappaB signaling. *Int J Oncol*, 45 (1):177-188.
- Ishii N, Funami K, Tatematsu M, Seya T, Matsumoto M. 2014. Endosomal localization of TLR8 confers distinctive proteolytic processing on human myeloid cells. *J Immunol*, 193 (10):5118-5128.
- Itoh H, Tatematsu M, Watanabe A, Iwano K, Funami K, Seya T, Matsumoto M. 2011. UNC93B1 physically associates with human TLR8 and regulates TLR8-mediated signaling. *PLoS One*, 6 (12):e28500.
- Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol*, 3 (6):499.
- Kaczanowska S, Joseph AM, Davila E. 2013. TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*, 93 (6):847-863.
- Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med*, 13 (5):552-559.

- Kaufmann SHE. 2014. Basiswissen Immunologie. Berlin u.a.: Springer.
- Kawai T, Akira S. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13 (5):816-825.
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11 (5):373-384.
- Kawasaki T, Kawai T. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*, 5:461.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10 (6):845-858.
- Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO. 2007. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*, 130 (5):906-917.
- Kunsch C, Rosen CA. 1993. NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. *Mol Cell Biol*, 13 (10):6137-6146.
- Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. 1992. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 12 (10):4412-4421.
- Leifer CA, Brooks JC, Hoelzer K, Lopez J, Kennedy MN, Mazzoni A, Segal DM. 2006. Cytoplasmic targeting motifs control localization of toll-like receptor 9. *J Biol Chem*, 281 (46):35585-35592.
- Lilyestrom W, Klein MG, Zhang R, Joachimiak A, Chen XS. 2006. Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. *Genes Dev*, 20 (17):2373-2382.
- Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N. 2014. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun*, 5:4767.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. 2017. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2.
- Lundin A, Rondahl H, Walum E, Wilcke M. 2000. Expression and intracellular localization of leptin receptor long isoform-GFP chimera. *Biochim Biophys Acta*, 1499 (1-2):130-138.
- Manal M, Chandrasekar MJ, Gomathi Priya J, Nanjan MJ. 2016. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. *Bioorg Chem*, 67:18-42.
- Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, Akira S, Teti G, Beninati C. 2009. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol*, 10 (6):587-594.
- Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. 2007. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist*, 12 (10):1247-1252.
- Marks MS. 1996. Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *The Journal of Cell Biology*, 135 (2):341-354.
- Mifsud EJ, Tan AC, Jackson DC. 2014. TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. *Front Immunol*, 5:79.
- Miggin SM, O'Neill LAJ. 2006. New insights into the regulation of TLR signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, 80 (2):220-226.
- Morin X, Daneman R, Zavortink M, Chia W. 2001. A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (26):15050-15055.

- Mrowka R, Bluthgen N, Fahling M. 2008. Seed-based systematic discovery of specific transcription factor target genes. *FEBS J*, 275 (12):3178-3192.
- Murphy K. 2018. Janeway Immunologie. 9. Aufl. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Nishiya T, DeFranco AL. 2004. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem*, 279 (18):19008-19017.
- Nishiya T, Kajita E, Miwa S, Defranco AL. 2005. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem*, 280 (44):37107-37117.
- Noguchi K, Gel YR, Brunner E, Konietzschke F. 2012. nparLD: an R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *Journal of Statistical Software*, 50 (12).
- Ogawa H, Inouye S, Tsuji FI, Yasuda K, Umesono K. 1995. Localization, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (25):11899-11903.
- Ohto U, Tanji H, Shimizu T. 2014. Structure and function of toll-like receptor 8. *Microbes Infect*, 16 (4):273-282.
- Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschueren IC, Arts P, Garritsen A, van Eenennaam H, Sturm P, Kullberg BJ, Hoischen A, Adema GJ, van der Meer JW, Netea MG, Joosten LA. 2014. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (42):E4478-4484.
- Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J-P, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M. 2013. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *Jama*, 309 (11):1154-1162.
- Pelka K, Shibata T, Miyake K, Latz E. 2016. Nucleic acid-sensing TLRs and autoimmunity: novel insights from structural and cell biology. *Immunol Rev*, 269 (1):60-75.
- QIAGEN. 2015. QIAprep® Miniprep Handbook.
- R-Core-Team. 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Schon MP, Schon M. 2008. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene*, 27 (2):190-199.
- Shah G, Patel B, Chorawala M. 2014. Toll like receptors: an overview. *International Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2 (2).
- Skerra A, Schmidt TG. 1999. Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag. *Biomol Eng*, 16 (1-4):79-86.
- Tanji H, Ohto U, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. 2013. Structural reorganization of the Toll-like receptor 8 dimer induced by agonistic ligands. *Science*, 339 (6126):1426-1429.
- Tanji H, Ohto U, Motoi Y, Shibata T, Miyake K, Shimizu T. 2016. Autoinhibition and relief mechanism by the proteolytic processing of Toll-like receptor 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 (11):3012-3017.
- Tanji H, Ohto U, Shibata T, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, Miyake K, Shimizu T. 2015. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nat Struct Mol Biol*, 22 (2):109-115.
- Terpe K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60 (5):523-533.

- Thomas P, Smart TG. 2005. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51 (3):187-200.
- Trowbridge IS, Collawn JF, Hopkins CR. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol*, 9:129-161.
- UniProt-Consortium. 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45 (D1):D158-D169.
- Verdone L, Agricola E, Caserta M, Di Mauro E. 2006. Histone acetylation in gene regulation. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5 (3):209-221.
- Vigna E, Naldini L. 2000. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med*, 2 (5):308-316.
- Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Giron CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, Lavidas I, Liu Z, Loveland JE, Maurel T, McLaren W, Moore B, Mudge J, Murphy DN, Newman V, Nuhn M, Ogeh D, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Zadissa A, Frankish A, Hunt SE, Kostadima M, Langridge N, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Aken BL, Cunningham F, Yates A, Flicek P. 2018. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res*, 46 (D1):D754-D761.
- Zhang Y, Zeng Y. 2019. Curcumin reduces inflammation in knee osteoarthritis rats through blocking TLR4 /MyD88/NF-kappaB signal pathway. *Drug Dev Res*.
- Zimmer M. 2002. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev*, 102 (3):759-781.
- Zouali M, La Cava A. 2019. Editorial: Innate Immunity Pathways in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 10:1245.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Übersicht über Lokalisation, Liganden und Signalwege humaner TLRs.....	5
Abb. 1.2: Schematische Darstellung von TLR8	7
Abb. 3.1: Aufbau der <i>Addgene</i> -Plasmide: <i>pcDNA3-TLR5-CFP</i> und <i>pcDNA3-TLR8-YFP</i>	11
Abb. 3.2: Einfügen einer Mutation in einen DNA-Strang mittels <i>Site-directed mutagenesis</i>	14
Abb. 3.3: Aufbau des Luciferase-Reporterkonstrukts	19
Abb. 3.4: Basensequenz der NF- κ B-empfindlichen Promotorregion	19
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Typen von TLR8-Mutanten	29
Abb. 4.2: Schematische Darstellung von TLR8 mit Hervorhebung potentieller Lokalisierungssequenzen	30
Abb. 4.3, Teil A: Zeitlicher Verlauf der relativen Luciferaseintensität von Luciferase-Reporterzellen mit Expression von durch R848 stimulierbaren TLR8-Konstrukten.....	33
Abb. 4.4: Vergleich der Aktivierungsgeschwindigkeit von Luciferase-Reporterzellen mit transienter Expression von TLR8-Konstrukten nach R848-Stimulation	38
Abb. 4.5: Zeitabhängiger Verlauf der relativen Luciferaseaktivität in stabil TLR8- bzw. TLR5/8 exprimierenden Luciferase-Reporterzellen infolge Stimulation mit R848 in unterschiedlichen Konzentrationen	40
Abb. 4.6: Vorhergesagte 3D-Struktur des TLR8-YFP-Fusionsproteins	43
Abb. 4.7: Mikroskopiebilder von HEK293-Zellen mit transienter Expression von TLR8-Wildtyp und TLR8- Δ TIR	45
Abb. 4.8: Übersicht über das Aktivierungsverhalten der stabilen TLR5/8-Zelllinie infolge Zugabe verschiedener Medikamente	46

Abb. 4.9: Medikamenteninduzierte Stimulation der stabilen TLR5/8- und TLR8-Zelllinien.....	48
--	----

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Übersicht über generierte TLR8-Konstrukte.....	15
Tab. 3.2: Übersicht über Zellzahl und -konfluenz bei transienten Transfektionen in 6-Well-Platten	21
Tab. 4.1: Übersicht über die Grundstruktur potentieller Lokalisierungssequenzen	30
Tab. 8.1: Zellen und entsprechend verwendete Zellkulturmedien	65
Tab. 8.2: Rezepte der verwendeten Medien	66
Tab. 8.3: Verwendete Primer.....	67

8.3 Materialien

Tab. 8.1: Zellen und entsprechend verwendete Zellkulturmedien

Kulturmedium	HEK293-Zellen HEK293T-Zellen
Kulturmedium mit Hygromycin B	Luciferase-Reporterzellen
Kulturmedium mit Hygromycin und Puromycin	Stabile TLR8-Reporterzellen Stabile TLR5/8-Reporterzellen

Tab. 8.2: Rezepte der verwendeten Medien

Kulturmedium	
DMEM (high Glucose, L-Glutamin)	500 ml
FKS	50 ml
Pen/Strep	5 ml
Kulturmedium mit Hygromycin B	
DMEM (high Glucose, L-Glutamin)	500 ml
FKS	50 ml
Pen/Strep	5 ml
Hygromycin B (50 mg/ml)	1 ml
Kulturmedium mit Hygromycin B und Puromycin	
DMEM (high Glucose, L-Glutamin)	500 ml
FKS	50 ml
Pen/Strep	5 ml
Hygromycin B (50 mg/ml)	1 ml
Puromycin (10 mg/ml)	50 µl
Luciferinmedium	
DMEM (Glucose 4.5 g/l)	500 ml
FKS	50 ml
Pen/Strep	2.5 ml
200 mM L-Glutamin	2.5 ml
1 M HEPES-Puffer	5.0 ml
Luciferin D	39.24 mg
Kryomedium	
DMEM (high Glucose, L-Glutamin)	40 ml
FKS	5 ml
DMSO	5 ml

Tab. 8.3: Verwendete Primer

TLR8-mutY871A	
Sense-Primer 1	ctggacattactccagcagtttc
Antisense-Primer 1	aaaccaaacatcccaggcaaacaaatggtgagccaggg
Sense-Primer 2	accatttgttgcctgggatgttggttatataataatg
Antisense-Primer 2	gaggtgtcgatgatggcc
TLR8-mutY888A	
Sense-Primer 1	ctggacattactccagcagtttc
Antisense-Primer 1	gagacctggcgcttttaccttagctaaacacacat
Sense-Primer 2	gtaaaaggcgccaggtctcttccacatccca
Antisense-Primer 2	gaggtgtcgatgatggcc
TLR8-Δ871-874	
Sense-Primer 1	ctggacattactccagcagtttc
Antisense-Primer 1	ataaaccaaaacaaatggtgagccaggg
Sense-Primer 2	catttgtttggttatataataatgtgtgttagctaa
Antisense-Primer 2	gaggtgtcgatgatggcc
TLR8-Δ928-933	
Sense-Primer 1	ctggacattactccagcagtttc
Antisense-Primer 1	ctctagacatcggtctcttcaaggtgg
Sense-Primer 2	gagagccgatgtctagaggagagggattggg
Antisense-Primer 2	cgagctctagcatttaggtgaca
TLR8-Δ979-982	
Sense-Primer 1	ctggacattactccagcagtttc
Antisense-Primer 1	ccattagcctctgaaaagctgttttaagttccagct
Sense-Primer 2	acagcttttcagaggctaattggatgagaacat
Antisense-Primer 2	cgagctctagcatttaggtgaca
TLR8-Δ1007-1010	
Sense-Primer 1	ctggacattactccagcagtttc
Antisense-Primer 1	gctgccgctgagaatgctgtaacactggct
Sense-Primer 2	attctcagcggcagcggatctgtaaga
Antisense-Primer 2	cgagctctagcatttaggtgaca

Tab. 8.3: Verwendete Primer

TLR8- Δ TIR	
Sense-Primer 1	ctggacattactccagcagtttc
Antisense-Primer 1	tcaccatctcgaggaaagtttgggatgtggaaagag
Sense-Primer 2	catcccaaactttcctcgagatggtgagcaagg
Antisense-Primer 2	cgagctctagcatttaggtgaca
TLR5/8	
LI_A_FW	ctggacattactccagcagtttc
T8-Chimer-rev	gctcttcacacatgaaacacaagttgtagctccag

Geräteliste

Gelelektrophorese

Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad
PeqPower 250	Peqlab Biotechnologie GmbH

Mikroskope und Zubehör

Axiovert 25	Zeiss
AxioCam mRM	Zeiss
AxioObserver Z1	Zeiss
ZEN 2012 (blue edition)	Zeiss
CFP-Filterset	Zeiss
Anregungsfilter	Artikelnummer: F39-438 Typ: Semrock BrightLine HC 438/24
Strahlteiler	Artikelnummer: F38-458 Typ: HC Strahlenteiler BS-458
Emissionsfilter	Artikelnummer: F37-483 Typ: Semrock BrightLine HC 483/32
YFP-Filterset	Zeiss
Anregungsfilter	Artikelnummer: F74/417 Typ: Semrock BrightLine HC 416/501
Strahlteiler	Artikelnummer: F38-458 Typ: HC Strahlenteiler BS-520
Emissionsfilter	Artikelnummer: F37-483 Typ: Semrock BrightLine HC 542/27

Pipetten

Eppendorf Research plus 100 bis 1000 µl	Eppendorf
Eppendorf Research plus 20 bis 200 µl	Eppendorf
Eppendorf Research plus 10 bis 100 µl	Eppendorf
Eppendorf Research plus 0,5 bis 10 µl	Eppendorf
Eppendorf Research pro Multikanalpipette 0.5 bis 10 µl	Eppendorf

Zentrifugen

Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific
Mini Zentrifuge	Roth
Zentrifuge 5424R	Eppendorf
Zentrifuge 5702	Eppendorf
ALPS 50V Microplate Heat Sealer	Thermo Scientific
CO ₂ -Inkubator C150	Binder
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
Lab dancer	IKA
Laminair Model 1.2	Holten
MaxQ 6000	Thermo Scientific
NanoDrop 8000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
Präzisionswaage EG 420-3NM	Kern & Sohn
Safe Imager	Invitrogen
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Thermomixer comfort	Eppendorf
TopCount-NXT –	
Microplate Scintillation & Luminescence Counter	Packard
Wasserbad	Memmert

Plasmide

<i>pcDNA3-TLR5-CFP</i> von Doug Golenbock	<i>Addgene</i> Plasmid #13019
<i>pcDNA3-TLR8-YFP</i> von Doug Golenbock	<i>Addgene</i> Plasmid #13024

Software

Endnote X7.8	Thomson Reuters
Excel 2016	Microsoft
Inkscape 0.92	
PyMOL	DeLano Scientific LLC
PowerPoint 2016	Microsoft
R version 3.4.0	The R Foundation
Pakete: nparLD, ggplot2	
StepOnePlus System Software	Thermo Scientific
Vector NTI 9.1.0	Invitrogen
Word 2016	Microsoft

Chemikalien und Lösungen

Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
Descosept Flächendesinfektion	Dr. Schumacher
DMEM (mit high Glukose, L-Glutamin)	Gibco
DMEM (mit high Glukose, ohne L-Glutamin/Phenolrot)	PAA
DMSO	Merck
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific
Dulbecco's PBS (1x)	PAA
Endotoxinfreies Wasser	InvivoGen
Ethanol	Roth
FKS	Biochrom
HEPES Buffer 1M	PAA
Hygromycin B (50 mg/ml)	Invitrogen
Isopropanol 100%	Roth
LB-Medium (Luria/Miller)	Roth
L-Glutamin	PAA
Luciferin, free acid	Promega
Luminaris HiGreen High ROX qPCR MM	Thermo Scientific
Restriktionsenzyme	NEB
Roti-Fect	Roth
Pen/Strep (10.000 U/ml Pen, 10.000 µg/ml Strep)	Biochrom
Puffer für Restriktionsenzyme	NEB
Puromycin (10 mg/ml)	InvivoGen
S.O.C. Medium	Invitrogen
SYBR®Safe	Thermo Scientific
T1 Thermocycler	Biometra
T4 DNA Ligase	NEB
T4 DNA Ligase Reaktionspuffer	NEB
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% in PBS)	Biochrom

Verbrauchsmaterialien

Cryo.s Einfrierröhrchen; 2 ml	Greiner bio-one
Lab-Tek™ Chambered Coverglass	Thermo Scientific
8-Well Kammer, 1.0 Borosilicate Coverglass	Nunc
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems
PCR Tube 0,2 ml 8-Strip	VWR
Pipettenspitzen 50-1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 2-200 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 0,5-20 µl	Eppendorf
QIAprep Spin Miniprep Kit; 250	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
Reaktionsgefäße 2 ml safe-lock	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml safe-lock	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,5 ml safe-lock	Eppendorf
Reaktionsgefäße 200 µl	Roth
Röhrchen 50 ml Cellstar® Tubes	Greiner bio-one
Röhrchen 15 ml Cellstar® Tubes	Greiner bio-one
Serologische Pipette 10 ml	Greiner bio-one
Serologische Pipette 5 ml	Greiner bio-one
Verschlussfolie für real-time PCR-Platten	Brand
Zellkulturflasche Filter-Schraubkappe, 75 cm ²	Biochrom
Zellkulturflasche Filter-Schraubkappe, 25 cm ²	Biochrom
96-Well-Microplatte, PS, F-Boden, weiß, steril	Greiner bio-one

8.4 Danksagung

Ich danke meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ralf Mrowka aus der Gruppe für Experimentelle Nephrologie, Universitätsklinikum Jena, für die allzeit unkomplizierte Betreuung und stets tatkräftige Unterstützung bei der Ausarbeitung des Themas, den Laborarbeiten und schließlich der Auswertung der Ergebnisse. Zudem möchte ich mich für die unerschöpfliche Geduld bei der Beantwortung aller meiner Fragen bedanken.

Ebenso danke ich den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Frau Dr. Stefanie Reuter, Frau Dr. Kristina Herold sowie Frau Silke Noßmann, die jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und für eine entspannte Arbeitsatmosphäre sorgten.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Freundin und Familie, die stets mit großer Zuversicht an die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt und mir bei Bedarf einen liebevollen Tritt in den Hintern gegeben haben.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Ralf Mrowka

Dr. Stefanie Reuter

Dr. Kristina Herold

Silke Noßmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bern, 24. 11. 2020

Ort, Datum



Unterschrift des Verfassers